

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik III der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann

**Einschluss des Nukleosidanalogons Gemcitabin in thermosensitive Liposomen  
zur temperaturgetriggerten Freisetzung  
- in vitro Untersuchung der Einschlussmodalitäten und Freisetzungskinetik -**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Jasmin Hahn  
aus Stolberg (Rheinland)

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Lars H. Lindner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Marc Dellian Priv. Doz. Dr. med. Irene Schmid Priv. Doz. Dr. med. Martin Eichhorn
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Martin Hossann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.03.2013

**Wer nie einen Fehler beging,  
hat nie etwas Neues ausprobiert.**

*Albert Einstein*

*Für meine Eltern, Oma Lisl*

*und meine Mom Denice*



## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 STRUKTURELLER AUFBAU VON LIPOSOMEN	1
1.1.1 Grundbausteine der Liposomen: Phospholipide	1
1.1.2 Phasenumwandlungstemperatur $T_C$	4
1.1.3 Thermosensitive Liposomen, TSL	4
1.1.3.1 DPPC, DSPC und P-Lyso-PC	4
1.1.3.2 DPPG <sub>2</sub>	6
1.1.4 Zeta-Potenzial (Oberflächenladung) und Größe	7
1.2 GEMCITABIN (2',2'-DIFLUORO-2'-DEOXYCYTIDIN)	8
1.2.1 Struktur und Wirkmechanismus von Gemcitabin	8
1.2.2 Resistenzentwicklung	11
1.3 HYPERTHERMIE	12
1.3.1 Hyperthermie und Chemotherapie	12
1.3.2 Thermosensitive Liposomen und Hyperthermie	13
1.3.3 Hitzeschockprotein HSP70 und Gemcitabin	14
1.4 DAS PANKREASKARZINOM	15
1.4.1 Das Pankreaskarzinom aus klinischer Sicht	15
1.4.2 Einteilung der Pankreasneoplasien	15
1.4.3 Pathogenese des Pankreaskarzinoms	16
1.4.4 Diagnostik	16
1.4.5 Staging	18
1.4.6 Therapieansätze und 5-Jahres-Überlebensraten	18
1.5 AUFGABENSTELLUNG	20
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
2.1 MATERIALIEN	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 verwendete Lösungen	21
2.1.3 Zellkultur	22

2.2	METHODEN TEIL I	
	HERSTELLUNG UND IN VITRO ANALYTIK VON GEMCITABIN-TSL	23
2.2.1	Qualitativer und quantitativer Nachweis von 2'-Deoxyuridin und Gemcitabin   UV/VIS Spektrometrie	23
2.2.2	Thermostabilität von dU und Gemcitabin bei Hyperthermie	24
2.2.3	Temperaturstabilität von Gemcitabin in fetalem Kälberserum (FCS)	25
2.2.4	pH-Metrie	25
2.2.5	Haltbarkeit von Gemcitabin	26
2.2.6	Präparation thermosensitiver Liposomen	26
2.2.7	Umpuffern mittels Säulenchromatographie	27
2.2.8	Qualitätskontrolle: mittels Photonenkorrelations-Spektroskopie	27
2.2.9	Lipidgehaltbestimmung (Phosphatbestimmung)	28
2.2.10	Dünnschichtchromatographie	28
2.2.11	Indirekter Einschluss von CF	28
2.2.12	Beladen der Liposomen mit Wirkstoff	29
2.2.13	Quantitative Bestimmung des eingeschlossenen Wirkstoffs	29
2.2.14	Temperaturöffnungskurve der Gemcitabinliposomen	30
2.3	METHODEN TEIL II - ZELLKULTUR	32
2.3.1	Zelllinien	32
2.3.2	Zellzahlbestimmung	33
2.3.3	Kryokonservierung	33
2.3.4	Einfriervorgang	34
2.3.5	Auftauen	34
2.3.6	Mycoplasmentest	35
2.3.7	Wachstumsverhalten der individuellen Zelllinien - Ermitteln IC <sub>50</sub>	35
2.3.8	Gemcitabinempfindlichkeit der individuellen Zelllinien (IC <sub>50</sub> )	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	TEIL I - HERSTELLUNG UND ANALYTIK VON GEMCITABIN-TSL	38
3.1.1	Qualitativer und quantitativer Nachweis von 2'-Deoxyuridin und Gemcitabin   UV/VIS Spektrometrie	38
3.1.1.1	Ergebnisse für dU	39
3.1.1.2	Ergebnisse für Gemcitabin	40
3.1.2	Stabilität von dU und Gemcitabin bei Hyperthermie	42
3.1.3	Stabilität von Gemcitabin in Fetalem Kälberserum (FCS)	43
3.1.4	pH-Metrie	44
3.1.5	Gemcitabin - Haltbarkeit	44
3.1.6	Quantitativer Nachweis des eingeschlossenen Wirkstoffs (dU/Gemcitabin)	45
3.1.7	Qualitätskriterien	46
3.1.7.1	Größe, Zetapotenzial und Polydispersionsindex (PDI)	46
3.1.7.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	48
3.1.8	Direkter Einschluss	50
3.1.8.1	dU-Liposomen	50

3.1.9	Indirekter temperaturabhängiger Einschluss	50
3.1.9.1	Vorversuch mit CF-Liposomen	50
3.1.9.2	Gemcitabineinschluss in Glucose-5%-haltige Liposomen	51
3.1.9.3	Einschluss mit verschiedenen Lipidkonzentrationen	53
3.1.9.4	Gemcitabineinschluss in HN-Puffer-haltige und Citrat-haltige Liposomen	55
3.1.10	Zusammenfassung der Versuchsreihen zum indirekten Gemcitabineinschluss	57
3.1.11	Temperaturöffnungskurve	59
3.2	TEIL II – ZELLKULTUR	61
3.2.1	MIA PaCa2-Zellen	61
3.2.2	FG-Zellen	62
3.2.3	L3.6-Zellen	64
3.2.4	Gemcitabinbehandlung mit freiem Wirkstoff – Ermittlung der IC <sub>50</sub>	65
3.2.4.1	MIA PaCa2	65
3.2.4.2	FG	66
3.2.4.3	L 3.6	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
4.1	TEIL I – HERSTELLUNG UND ANALYTIK VON GEMCITABIN-TSL Thermosensitive Liposomen aus DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)	68
4.1.1	Größe der Vesikel	69
4.1.2	pH-Metrie	69
4.2	2'-DEOXYURIDIN (DU)	70
4.3	GEMCITABINNACHWEIS	70
4.4	HALTBARKEIT VON GEMCITABIN	71
4.5	METHODEN FÜR DEN WIRKSTOFFEINSCHLUSS IN TSL	71
4.5.1	Glucose-5%-Liposomen als Basis der Gemcitabin-TSL	73
4.5.2	HN-Puffer- und Citrat-Puffer-Liposomen als Basis der Gemcitabin-TSL	74
4.5.3	Interaktion von Gemcitabin mit den Phospholipiden	75
4.5.4	Einschlusseffizienz	76
4.6	TEMPERATURÖFFNUNGSVERHALTEN VON GEMCITABIN-TSL	77
4.7	TEIL II – ZELLKULTUR	78
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>87</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>88</b>



## ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

<b>Abb. 1.1</b>	Schematische Darstellung der temperatur-getriggerten Wirkstoff-freisetzung aus thermo-sensitiven Liposmen (TSL)	1
<b>Abb. 1.2</b>	Strukturelle Zusammensetzung eines Phospholipids am Beispiel von DPPC, DSPC und P-Lyso-PC.	2
<b>Abb. 1.3</b>	höhermolekulare Anordnungen von Phospholipiden und Korrelation mit der Molekülform.	3
<b>Abb. 1.4 a</b>	Konfigurationsveränderung der Acylketten bei Erwärmung von <i>trans</i> zu <i>gauche</i> als Grundlage der temperaturgesteuerten Permeabilitäts-veränderung.	4
<b>Abb. 1.4 b</b>	Auswirkung des pH-Wertes auf die Hydrolyserate von Phosphocholin bei 40°C und bei 70°C (aus Grit und Grommlin 1993)	5
<b>Abb. 1.5</b>	Chemische Struktur von 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG <sub>1</sub> ) und 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglyceroglycerol (DPPG <sub>2</sub> )	7
<b>Abb. 1.6</b>	<b>a</b> Cytidin, <b>b</b> Gemcitabin (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin)	8
<b>Abb. 1.7</b>	Aufnahme und intrazellulärer Metabolismus von Gemcitabin (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin, dFdC).	10
<b>Abb. 1.8</b>	Prinzip der intravasalen Wirkstofffreisetzung mittels TSL und lokaler Hyperthermie. <b>a</b> – bei physiologischer Körpertemperatur sind die TSL stabil bei der Gefäßpassage; <b>b</b> – Durch lokale Erwärmung auf 41°C bis 42°C erfolgt die intravasale Wirkstofffreisetzung im erwärmten Gewebe. Eine milde Temperaturerhöhung kann erreicht werden durch lokale Hyperthermie oder Ultraschall (HIFU, high intensity focuse ultrasound).	14
<b>Abb. 3.1</b>	UV/VIS Spektrometrie von Gemcitabin in bidestilliertem Wasser	39
<b>Abb. 3.2</b>	Korrelation von Absorption und Konzentration von dU in unterschiedlichen Lösungen (gilt repräsentativ auch für Gemcitabin).	40
<b>Abb. 3.3</b>	Vergleichsmessung von Gemcitabin in verschiedenen Lösungsmitteln.	41
<b>Abb. 3.4</b>	Einfluss von Acetonitril auf die Absorptionswerte, wenn die Proben nicht unmittelbar vermessen werden.	41
<b>Abb. 3.5</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC): Elutionsdiagramm von 5-Fluorouridin, Gemcitabin und 2'-Deoxyuridin.	42
<b>Abb. 3.6</b>	Stabilität von Gemcitabin nach einstündiger Erwärmung bei 60°C	43
<b>Abb. 3.7</b>	Stabilität von Gemcitabin nach einstündiger Erwärmung in FCS bei 37°C und 42°C	44
<b>Abb. 3.8</b>	Photospektrometrische Überprüfung der Gemcitabinkonzentration bei Lagerung bei +4°C. Absorptionsmaxima wurden bei $\lambda = 265$ nm aufgezeichnet.	45
<b>Abb. 3.9</b>	Einfluss von Lipidresten auf die Messung des eingeschlossenen Wirkstoffs	46

<b>Abb 3.10</b>	Größenverteilung von Glucose-haltigen Gemcitabinliposomen (links) als Beispiel für eine mindere Qualität und HN-Puffer-haltige Gemcitabinliposomen (rechts) als Beispiel einer hochwertigen Liposomenlösung	47
<b>Abb. 3.11</b>	Vergleich von Größe und Zetapotenzial nach Herstellung der Liposomen (nativ), nach Aufkonzentrierung (Zentrifugation) und nach Beladen mit Gemcitabin	48
<b>Abb 3.12</b>	DC (Dünnschichtchromatographie)-Platten mit Proben der Charge [15/26] (→ Glucose-haltige Liposomen) nach Inkubation mit Gemcitabin	49
<b>Abb. 3.13</b>	<b>a</b> Säulenchromatographie der CF-Liposomen nach dem Beladen; <b>b</b> Auswertung des CF:Lipidverhältnisses der CF-Liposomen in Relation zur Inkubationszeit und -temperatur	51
<b>Abb. 3.14</b>	Graphische Auswertung der Gemcitabineinschlussversuche mit Glucose-5%-haltigen nativen Liposomen.	52
<b>Abb. 3.15</b>	Säulenchromatographie von Glucose-5%-haltigen Liposomenlösungen nach der Inkubation.	53
<b>Abb. 3.16</b>	Einfluss der Lipidkonzentration auf den Gemcitabineinschluss..	54
<b>Abb. 3.17</b>	Graphische Darstellung der Gemcitabin-Einschlussversuche in HN-Puffer-haltige und Citrat-Puffer-haltige Liposomen	56
<b>Abb. 3.18</b>	Einschlusseffizienz von HN-Puffer-haltigen und Citrat-Puffer-haltigen Liposomen im Vergleich.	57
<b>Abb. 3.19</b>	Zusammenfassung der Versuchsreihe zum indirekten temperatur-gesteuerten Gemcitabineinschluss.	58
<b>Abb. 3.20</b>	Wirkstofffreisetzung in HN-Puffer. Gemittelte Temperaturöffnungs-kurven von thermosensitiven Gemcitabinliposomen auf HN-Puffer-Basis und thermo-sensitiven Gemcitabinliposomen auf Citrat-Puffer-Basis.	60
<b>Abb. 3.21</b>	absolutes Wachstum von MIA PaCa2 Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen; Rechts: MIA PaCa2 Zellen in Kultur an Tag 4 (Phasenkontrastmikroskop; 32-fach)	61
<b>Abb. 3.22</b>	Analyse des relativen Wachstums der MIA PaCa2 Zellen mit unterschiedlichen Bezugs-punkten (zu Tag 1 und zum jeweiligen Vortag)	62
<b>Abb. 3.23</b>	absolutes Wachstum von FG Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen. Rechts: FG Zellen in Kultur an Tag 4 (Phasenkontrastmikroskop; 32-fach)	63
<b>Abb. 3.24</b>	Analyse des relativen Wachstums der FG - Zellen mit unterschiedlichen Bezugs-punkten (zu Tag 1 und zum jeweiligen Vortag)	64
<b>Abb. 3.25</b>	absolutes Wachstum von L 3.6 Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen. Rechts: L 3.6 Zellen in Kultur an Tag 4 (Phasenkontrastmikroskop; XX-fach)	64
<b>Abb. 3.26</b>	Analyse des relativen Wachstums der L 3.6 - Zellen mit unterschiedlichen Bezugspunkten (zu Tag 1 und zum jeweiligen Vortag)	65
<b>Abb. 3.27</b>	Gemcitabinempfindlichkeitsprüfung der MIA PaCa2 Zelllinie.	66
<b>Abb. 3.28</b>	Gemcitabinempfindlichkeitsprüfung der FG Zelllinie.	66
<b>Abb. 3.29</b>	Gemcitabinempfindlichkeitsprüfung der L 3.6 Zelllinie.	67



<b>Tab. 3.1</b>	Vergleich der Messergebnisse der UV/VIS-Spektrometrie und HPLC	42
<b>Tab. 3.2</b>	Dünnschichtchromatographie der thermosensitiven Liposomen vor und nach Inkubation. DSPC und DPPC lassen sich mit dieser Methode nicht trennen und werden somit gemeinsam abgebildet und berechnet.	49
<b>Tab 3.3</b>	Gemcitabin-TSL auf HN-Puffer-Basis und Gemcitabin-TSL auf Citrat-Puffer-Basis im Vergleich.	59



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

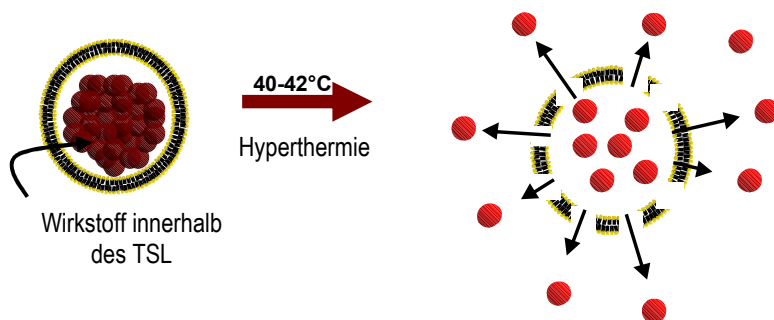
AP1	Aktivatorprotein 1 (Transkriptionsfaktor)
CA 19-9	Tumormarker
CA 50	Tumormarker
CF	Carboxyfluorescein
CT	Computertomographie
DAC	Duale asymmetrische Zentrifugation (von U. Massing entwickelte Methode zum aktiven Beladen präformierter Liposomen)
DC	Dünnschichtchromatographie
dCDA	Deoxycytidineaminase
dFdC	2',2'-Difluorodeoxycytidin = Gemcitabin (Gem)
dFdCDP	2',2'-Difluorodeoxycytidindiphosphat = Gemcitabindiphosphat
dFdCMP	2',2'-Difluorodeoxycytidinmonophosphat = Gemcitabinmonophosphat
dFdCTP	2',2'-Difluorodeoxycytidintriphosphat = Gemcitabintriphosphat
dFdU	2',2'-Difluorodeoxyuridin
dCK	Deoxycytidinkinase
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPPC	1,2 - Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPG <sub>2</sub>	1,2 - Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycol
DSPC	1,3 - Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DSPE-MPEG-2000	N-(carbonyl-methoxypolyethylenglycol-2000)-1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanylamin
dU	2'-Deoxyuridin
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
Em	Emissionswellenlänge
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ESP3	hydrogenisiertes Eierphosphatidylcholin
Ex	Exzitationswellenlänge
FCS	fetales Kälberserum
Gem	Gemcitabin(hydrochlorid)
HEAT	Hyperthermia European Adjuvant Trail

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HN	HEPES + NaCl (siehe Material und Methoden)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MDCT	Multi-detector Computertomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NEA	nicht-essenzielle Aminosäuren
NF-κB	Nuclear Transcriptionsfactor-KappaB
PBS	Phosphatgepuffertes Kochsalz
PDI	Polydispersionsindex
PEG	Polyethylenglycerin
<i>sn</i>	stereospezifische Numerierung
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSL	Thermosensitive Liposomen
US	Sonographie/Ultraschall
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WST1	Tetrazoliumsalz zur quantitativen Proliferationsbeobachtung (Zellkultur)



# 1 EINLEITUNG

Die Behandlung solider Tumoren beruht auf deren chirurgischen Resektion sowie häufig einer begleitenden Strahlentherapie und gegebenenfalls auch einer zusätzlichen systemischen Chemotherapie. Letztere wird eingesetzt, wenn bereits eine Fernmetastasierung vorliegt oder wenn von einem hohen Rezidivrisiko trotz Operation ausgegangen werden muss beziehungsweise der Tumor als nicht resektabel eingestuft wird (=neoadjuvante Chemotherapie). Limitierender Faktor der Chemotherapie ist die dosisabhängige Nebenwirkungsrate. Die Arbeitsgruppe Liposomen der KKG Hyperthermie (Leiter: PD Dr. med L.H. Lindner) beschäftigt sich mit dem Einschluss von Zytostatika in thermosensitive Liposomen. Es handelt sich dabei um Vesikel in einer Größe von 100 bis 200 nm mit einer Phospholipidaußenmembran, die ihren Inhalt durch Erwärmung auf Temperaturen von 40°C bis 42°C freisetzen. Bei einer selektiven Erwärmung des Tumors, z. B. im Rahmen einer Tiefenhyperthermiebehandlung (Issels et al. 2008) kommt es so zu einer hohen Wirkstofffreisetzung und Anreicherung in Tumoren (Lindner et al. 2004). Abb. 1 zeigt piktographisch die temperaturgesteuerte Wirkstofffreisetzung. Durch dieses Prinzip soll der Antitumoreffekt verbessert und gleichzeitig das Risiko systemischer Nebenwirkungen verringert werden.

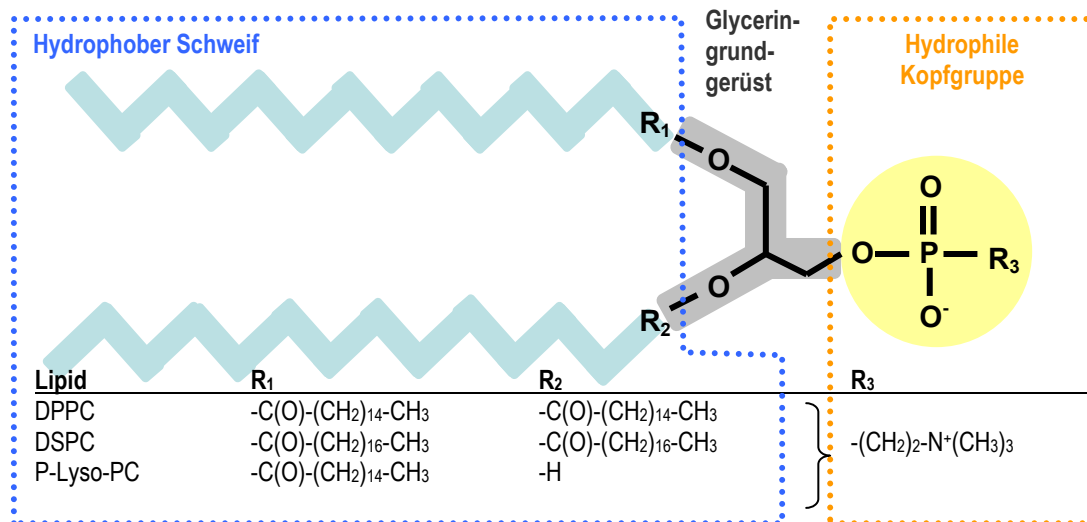


**Abb. 1.1** Schematische Darstellung der temperaturgetriggerten Wirkstofffreisetzung aus thermosensitiven Liposomen (TSL)

## 1.1 STRUKTURELLER AUFBAU VON LIPOSOMEN

### 1.1.1 Grundbausteine der Liposomen: Phospholipide

Phospholipide bestehen aus einem Grundgerüst, das entweder durch ein Glycerin- oder ein Sphingosinmolekül gebildet wird (New 1997) und an welche bis zu zwei Fettsäureketten kovalent über Esterbindungen gebunden sein können. Für diese Arbeit relevant sind lediglich die glycerinhaltigen Phospholipide. Dabei bildet das geladene Moleküle wie Phosphocholin und Phosphoglycerin die hydrophile, polare Kopfgruppe, das GlycerinGrundgerüst fungiert als Brückenelement und die Acylketten stellen den hydrophoben, apolaren ‚Schweif‘ (Kaufmann-Kolle 1986). Abb. 1.2 zeigt schematisch diesen strukturellen Aufbau am Beispiel von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC).



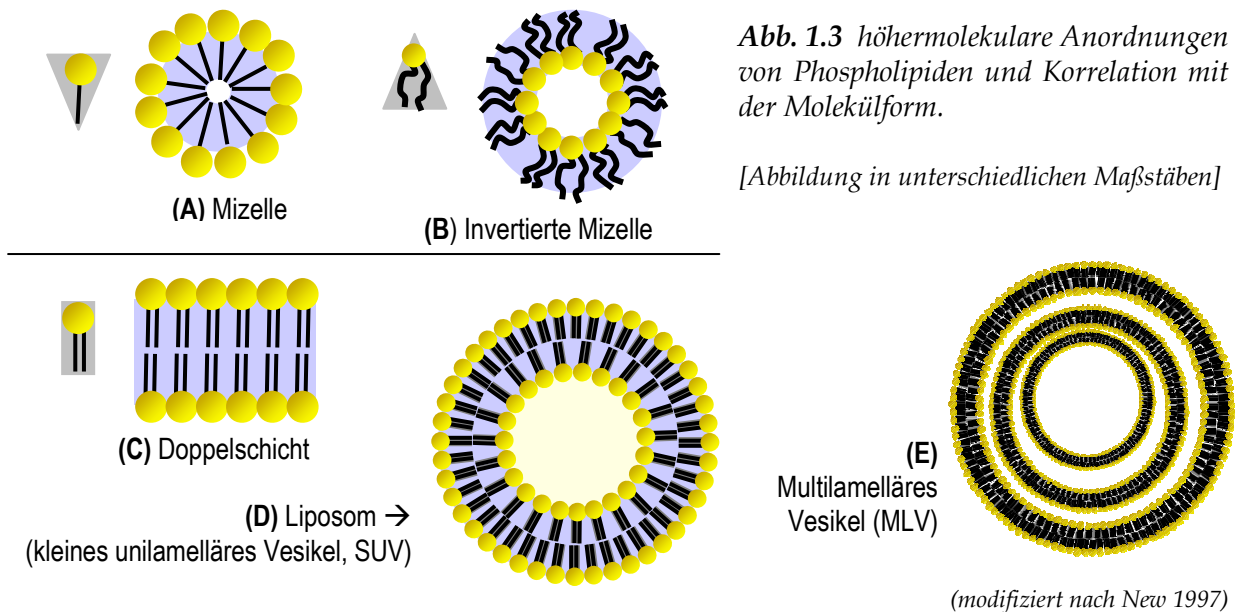
**Abb. 1.2** Strukturelle Zusammensetzung eines Phospholipids am Beispiel von DPPC, DSPC und P-Lyso-PC.

Aufgrund dieses amphipathischen Aufbaus neigen Phospholipide dazu in wässriger Lösung höhermolekulare Konglomerate zu bilden, bei denen sich die hydrophoben Anteile jeweils zueinander anlagern und die hydrophilen Kopfgruppen nach außen weisen. Je nach Verhältnis der hydrophilen und hydrophoben Anteile zueinander können Mizellen, Liposomen mit einer wässrigen inneren Phase und auch umgekehrte Aggregate entstehen, so genannte „hexagonal“ angeordnete „invertierte Mizellen“ (Lindner 2000).

Für die Ausbildung einer Doppelschicht, wie sie zur Ausbildung von Liposomen erforderlich ist, müssen Kopf- und Schwweifgruppe eine nahezu identische Grenzflächenbeanspruchung haben (Lindner 2000), sprich das Molekül hat eine annähernd tubuläre Form (New 1997). Bei einer Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten der Kopfgruppe resultieren eher konische Moleküle, die die Micellenbildung mit lipophilem Zentrum (z. B. P-Lyso-PC). Im umgekehrten Fall entstehen hexagonale Anordnungen mit wässrigem inneren Kompartiment. Diese Formgebung der Moleküle ergibt sich hauptsächlich aus der Anzahl und Konfiguration der Fettsäureketten (New 1997). Letztere genannte Formen eignen sich nur bedingt als Fahren für den Wirkstofftransport.

Phospholipide sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Doppelmembranen die wichtigsten Strukturelemente biologischer Membranen, was von Singer und Nicolson bereits 1972 in Form des ‚Flüssig-Mosaik-Modells‘ zur Darstellung der Organisation von Zellmembranen gezeigt wurde. Liposomen sind künstlich hergestellte Vesikel, wie sie aber auch zum Beispiel bei Endo- und Exozytosevorgängen natürlichweise entstehen.

Es werden uni- und multilamelläre Liposomen unterschieden (vgl. Abb. 1.3 (D) und (E)), wobei letztere immer die Vorstufe für unilamellare Liposomen darstellen. Mittels verschiedener technischer Verfahren wie Gefrier-Auftau-Vorgänge, Ultraschall oder Extrusion können aus multilamellären Liposomen unilamelläre Liposomen mit definierter Größe hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren der Extrusion angewendet.



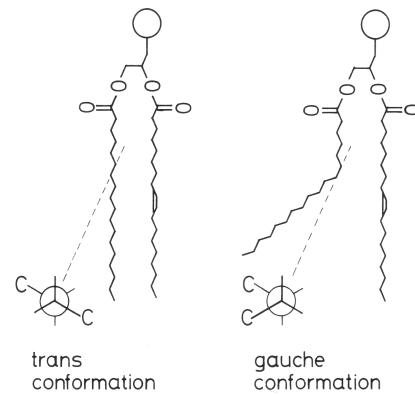
Die chemischen Eigenschaften von Phospholipiden werden von einer Vielzahl intramolekularer Parametern beeinflusst:

Die Kopfgruppe, welche bei den Liposomen nach außen weist, ist Hauptakteur in Hinblick auf intermolekulare Wechselwirkungen, da sie im Wesentlichen die Oberflächenladung (Zeta-Potenzial) der Liposomen bestimmt.

Strukturmerkmale des apolaren Teils wie Kettenlänge der Acylketten, Anzahl und Konfiguration von C-C-Doppelbindungen (cis- oder trans-) oder die Konformation der C-C-Einzelbindungen (*trans* oder *gauche*) sind wichtige Größen um das Verhalten der resultierenden höhermolekularen Strukturen wie Liposomen prädiktiv einzuschätzen (New 1997). Sie bestimmen hauptsächlich die Membranfluidität und die Phasenumwandlungstemperatur  $T_C$ .

### 1.1.2 Phasenumwandlungstemperatur $T_C$

Die Phasenumwandlungstemperatur spielt eine zentrale Rolle bei der Arbeit mit thermosensitiven Liposomen. Sie beruht auf dem Wechsel zwischen der trans- und der gauche-Konformation der Acylketten, wobei durch Erwärmung die Bildung der gauche-Form vermehrt auftritt und somit der Übergang der Membran von der gelartigen in die flüssigkristalline Phase ermöglicht wird. Abb. 1.4 aus New 1997 zeigt diese sterischen Veränderungen. Auf diesem Prinzip beruht die temperaturabhängige Permeabilitätsveränderung der Liposomen. Beeinflusst wird die Phasenumwandlungstemperatur unter anderem vom pH-Wert der Umgebung (Träuble und Eibl 1974).



**Abb. 1.4 a**

Konformationsveränderung der Acylketten bei Erwärmung von trans zu gauche als Grundlage der temperaturgesteuerten Permeabilitätsveränderung.

(aus New 1997, S. 10)

Die Phasenumwandlungstemperatur von Liposomen kann mithilfe der charakteristischen  $T_C$  der verwendeten Phospholipide näherungsweise errechnet werden. Eine präzise Bestimmung ist mittels Mikrocalorimetrie möglich (New 1997). Unterhalb der Phasenumwandlungstemperatur ist die Membran wenig durchlässig für hydrophile Substanzen.

### 1.1.3 Thermosensitive Liposomen, TSL

Die Anforderung an thermosensitive Liposomen ist, dass sie durch Temperaturveränderungen ihre Permeabilität möglichst schnell verändern sollen um so eine gezielte Freisetzung des eingeschlossenen Wirkstoffes zu ermöglichen. Zudem müssen sie so konzipiert sein, dass sie nicht nach intravenöser Applikation umgehend opsoniert vom retikuloendothelialen System in Lunge und Leber eliminiert werden.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Phospholipide, das Mengenverhältnis der Lipide zueinander, sowie die verwendeten wässrigen Lösungen entscheiden über die Eigenschaften und das Verhalten der Liposomen.

#### 1.1.3.1 DPPC, DSPC und P-Lyso-PC

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) ist das Lipid mit dem höchsten prozentualen Anteil bei der Herstellung von TSL. Es enthält zwei gesättigte C16-Fettsäureketten, somit eine gerade Anzahl an C-Atomen, wie es für die meisten

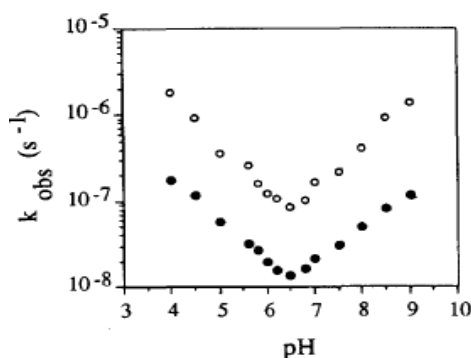
natürlich vorkommenden Phospholipide üblich ist (New 1997) und hat eine Phasenumwandlungstemperatur von  $T_c=41,5^\circ\text{C}$  (Mabrey et al. 1976).

1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-phosphocholin (DSPC) enthält zwei vollgesättigte C18-Fettsäureketten (Yatvin 1978) und hat eine Phasenumwandlungstemperatur von  $T_c=56,0^\circ\text{C}$  (Mabrey et al. 1976). Die Kombination von DPPC und DSPC wurde erstmals von Yatvin 1978 als ‚Urform‘ des Modells der temperaturgetriggerten Wirkstofffreisetzung beschrieben.

Da die wesentliche Wirkstofffreisetzung bereits unterhalb der eigentlichen Phasenumwandlung geschieht, müssen die beiden Lipide in einem geeigneten Verhältnis gemischt werden um eine Freisetzung im gewünschten Temperaturbereich ermöglichen (Lindner et al. 2004, Yatvin 1978).

In der klinischen Anwendung der Hyperthermie werden im Tumor Temperaturen von ca.  $41^\circ\text{C}$  bis  $42^\circ\text{C}$  erreicht (Issels, Lindner 2010), sodass die alleinige Kombination von DPPC und DSPC nicht ausreicht um die optimale Freisetzungskinetik zu erreichen. Des Weiteren werden die so konzipierten Liposomen aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit natürlichen Lipiden schnell vom retikuloendothelialen System (RES) erkannt und eliminiert (Lindner et al. 2004).

Abbauprodukte der Phospholipide sind so genannte Lysolipide, wie Monoacylphosphocholin (P-Lyso-PC). P-Lyso-PC ist ein Phospholipid, das an Position 1 oder 2 seine Acylkette verloren hat, was bei der Liposomenherstellung und der Wirkstoffbeladung beispielsweise durch Verwendung von Säuren oder physiologisch durch enzymatische Hydrolyse durch das Plasmaenzym Phospholipase A (hier dann nur an Position 2) geschehen kann (New 1997). Hohe Anteile an Lyso-PC führen letztlich zur Zerstörung der Lipiddoppelschichten und somit zur Lyse der Liposomen.



**Abb. 1.4 b**

Auswirkung des pH-Wertes auf die Hydrolyserate von Phosphatidylcholin bei  $40^\circ\text{C}$  (●) und bei  $70^\circ\text{C}$  (○).

(aus Grit und Grommlin 1993)



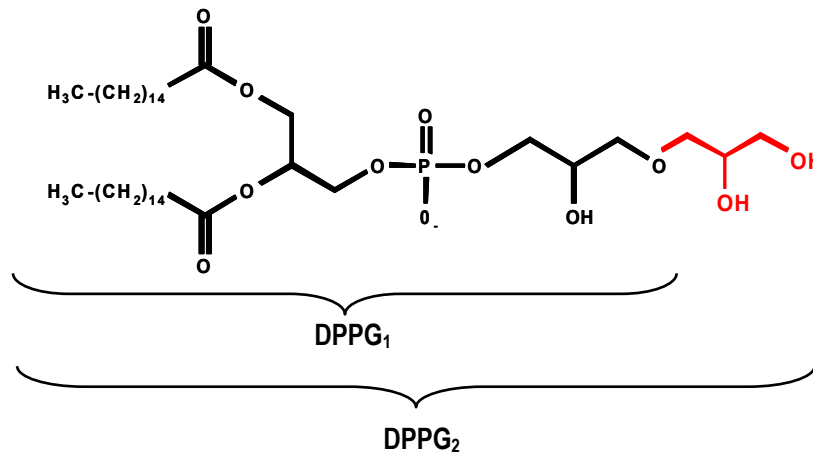
Ursachen für die Entstehung von Lyso-PC können ein zu niedriger oder zu hoher pH-Wert oder thermische Einwirkung sein (Grit und Grommlin 1993, Abb 1.5), allerdings führt erst ein Lyso-PC-Gehalt >10% zu insuffizienter Bildung liposomaler Strukturen. Um diese Menge zu erreichen, müssten die Phospholipide über 100 Stunden bei 70°C inkubiert werden.

Die Korrelation zwischen der Entstehung von Lyso-PC und pH-Wert verhält sich wie folgt: die Hydrolyserate von gesättigtem Phosphatidylcholin ist bei pH 6,5 am niedrigsten. Bei niedrigeren und höheren pH-Werten steigt die Hydrolyserate jeweils nahezu linear an (Grit u. Grommlin 1993).

### 1.1.3.2 DPPG<sub>2</sub>

Um die Phasenumwandlungstemperatur in den Zielbereich zwischen 40°C und 42°C zu korrigieren und einem schnellen Abbau der Liposomen in Serum vorzubeugen, werden synthetische Phospholipide in die Liposomenmembranen eingebracht. Oft handelt es sich hierbei um Derivate von Polyethylenglycol (PEG) oder Monosialogangliosiden. In der klinischen Anwendung konnte für eine PEG-haltige Formulierung zwar die längere Zirkulationszeit und die Reduktion der zytostatikumspezifischen Nebenwirkungen nachgewiesen werden, dafür traten aber andere unerwünschte Wirkungen auf (Chen et al. 2008). Zwar kam es zu einer deutlich geringeren Kardiotoxizität bei den untersuchten Formulierungen, dafür zeigte sich allerdings ein ausgeprägte Hand-Fuß-Syndrom, welches auf die vermehrte Extravasation der langzeitzirkulierenden Liposomen im Kapillarbett der Akren zurück zu führen ist. Darüber hinaus konnte keine verbesserte Antitumortoxizität für PEG-Liposomen gezeigt werden (Koning und Lindner 2010).

Bei 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerin (DPPG<sub>2</sub>) handelt es sich um ein synthetisches Lipid, welches im Vergleich zum natürlich vorkommenden Lipid 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerin (DPPG<sub>1</sub>) ein zusätzliches Glycerinmolekül am polaren Ende trägt. DPPG<sub>2</sub> wurde von Herrn Prof. Dr. Eibl am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen entwickelt (Eibl, Internationale Veröffentlichungsnummern WO 97/30058, WO 03/095464 A1 und WO 2004/0262282 A1) und zeigt nachweislich eine erhöhte Serumstabilität der Liposomen im Vergleich zu einer PEG-haltigen Formulierung (Hossann et al. 2007). Die Phasenumwandlungstemperatur T<sub>c</sub> von DPPG<sub>2</sub> liegt bei 39,7°C (Schagon 1996).



**Abb. 1.5** Chemische Struktur von 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerin (DPPG<sub>1</sub>) und 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphodiglycerin (DPPG<sub>2</sub>)

#### 1.1.4 Zeta-Potenzial (Oberflächenladung) und Größe

Liposomen können anhand ihrer Größe und des Zeta-Potenzials (ζ-Potenzial, Oberflächenladung) charakterisiert werden. Diese Parameter spielen eine Rolle bei der Detektion durch das retikuloendotheliale System und bei der Extravasation (Drummond 2008). Während DPPC und DSPC ungeladene Kopfgruppen haben, ist DPPG<sub>2</sub> ein negativ geladenes Molekül. Bei der Verwendung von negativ geladenen Phospholipiden ist eine Interaktion mit Kationen bekannt, die sich auch auf die Phasenumwandlungstemperatur auswirkt (New 1997). Träuble und Eibl beschrieben 1974 bereits, dass allein die Zugabe von Kationen eine Phasenumwandlung temperaturunabhängig provozieren kann. Im Fall der thermosensitiven Liposomen spielt das bei der Betrachtung des zum Einschluss vorgesehenen Wirkstoffs eine Rolle. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Liposomen mit einer negativen Oberflächenladung schneller vom RES erkannt und eliminiert werden (Gregoriadis 1974, Drummond et al. 1999), allerdings sollte diese Beurteilung individuell für die jeweilige Formulierung erfolgen unter Berücksichtigung der Liposomengröße, Membranzusammensetzung und Dichte der Ladungsträger in der Membran (Drummond et al. 1999). Speziell für Phosphatidylglycerin-haltige Liposomen wurde eine weniger starke Bindung von Serumproteinen und damit auch ein geringerer Abbau bewiesen, als dies bei anderen Liposomen mit anionischen Lipiden der Fall ist (Drummond et al. 2008).

Für die Größe gilt vorweg ein Grundsatz: je größer die Liposomen sind, desto höher ist die Abbaurate im Blut (Drummond et al. 2008). Ein niedriger Durchmesser begünstigt die Extravasation und somit auch die Anreicherung in soliden Tumoren. Optimale

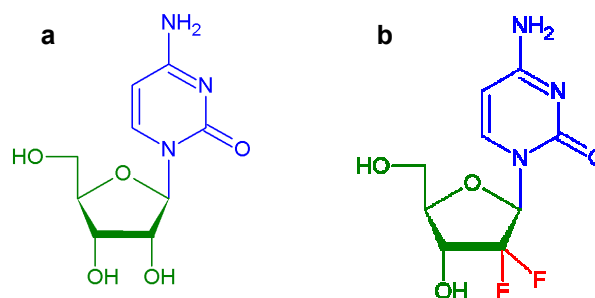
Akkumulationsergebnisse wurden für PEG-haltige Liposomen in einem Bereich von 100-120 nm beobachtet, wohingegen noch kleinere Partikel sich weniger stark anreicherten (Drummond et al. 2008). Das Problem dieser PEG-Liposomen liegt allerdings in der geringen quantitativen Aufnahme in das Tumorgewebe. Nach der Extravasation werden unter 5% liposomalen Wirkstoffs in die Zellen aufgenommen, allerdings ist er in dieser Form noch nicht bioverfügbar, da er noch im Liposom eingeschlossen ist. Ein wesentliches Prinzip zur Verbesserung der Wirksamkeit dieser langzeitzirkulierenden Liposomen ist der ERP-Effekt (=enhanced permeability and retraction effect). Dabei wird durch gemeinsame Injektion des liposomalen Wirkstoffs und vasoaktiven Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) die intrazelluläre Wirkstoffanreicherung verfünffacht (Seynhaeve et al. 2007).

So genannte „Nanocarrier“ mit einer Größe von 40-50 nm kommen für den Wirkstofftransport eher nicht in Frage, da nur geringe Wirkstoffmengen im inneren wässrigen Kompartiment eingeschlossen werden können und diese kleinen Partikel aufgrund der hohen Membrankrümmung instabiler sind (Drummond et al. 2008, Hossann et al. 2010).

## 1.2 GEMCITABIN (2',2'-DIFLUORO-2'-DEOXYCYTIDIN)

### 1.2.1 Struktur und Wirkmechanismus von Gemcitabin

Gemcitabin, chemischer Name 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (dFdC) ist ein Cytidinanalogon, das sich vom biologisch vorkommenden, körpereigenen Deoxycytidin lediglich dadurch unterscheidet, dass an Position 2' des Furanoserings die Wasserstoffatome durch zwei Fluoratome ausgetauscht wurden (Mini et al. 2006).



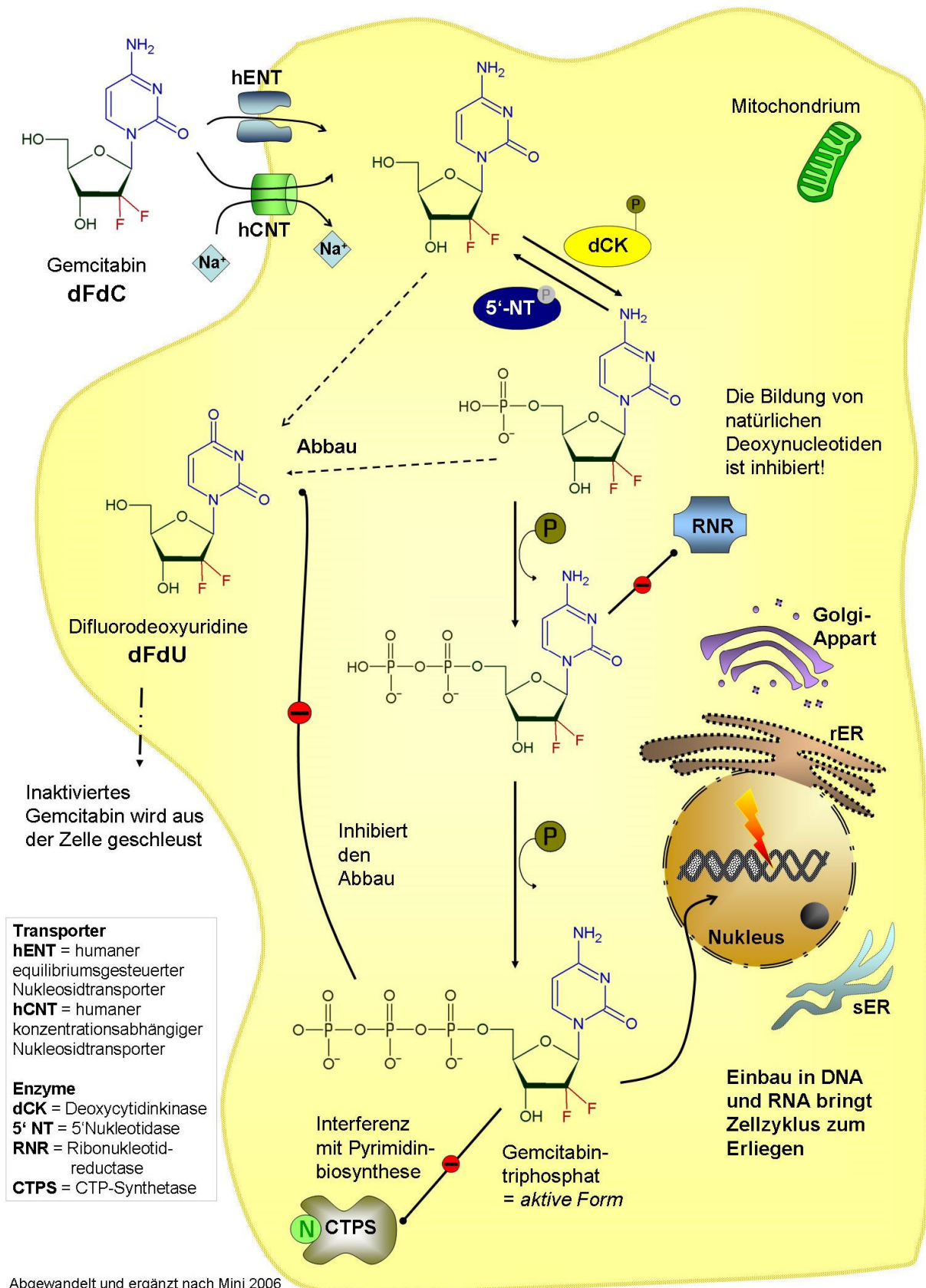
**Abb. 1.6** *a* Cytidin *b* Gemcitabin  
(2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin)

Gemcitabin wird aktiv über die Zellmembran transportiert mithilfe so genannter Nukleosidtransporter; hier gibt es sowohl Natrium-abhängige oder konzentrationsgesteuerte (hCNT, human concentrative nucleoside transporter) als auch Natrium-unabhängige oder equilibriumbesteuerte (hENT, human equilibrative nucleoside transporter) Typen (Gray et al. 2004, Baldwin et al. 2004). Das Ausmaß und die zelltypgebundene Expression

dieser Transporter entscheiden maßgeblich neben anderen Faktoren über die Sensitivität der Zelle für Gemcitabin oder eben über deren Resistenz (Mackey et al. 1998). Die Expression der verschiedenen Transporter ist darüber hinaus abhängig vom Zellzyklus beziehungsweise von der Bedarfslage der Zelle an Nucleosiden bei gesteigerter Proliferation (Pastor-Anglada 2004). Da Nukleoside hydrophile Moleküle sind, können sie die Zellmembran nicht ungehindert passieren. Transporter vom hENT-Typ ermöglichen durch erleichterte Diffusion die Nukleosidaufnahme in die Zelle und spielen somit eine wichtige Rolle im Salvage-Mechanismus der Nukleotidsynthese (Baldwin et al. 2004). Der hCNT-Typ dagegen beruht auf einer Kopplung der Nukleosidaufnahme an den ins Zellinnere gerichtete Natriumioneneinstrom (Gray et al. 2004). Oft treten beide Transportertypen parallel auf. Ihre Funktion ist zudem Zelltyp-gebunden, das heißt sie sind nicht ausschließlich wichtig für die Bedarfsdeckung der Zelle an Nukleosiden, sondern nehmen ebenso als Teil von komplexen Reaktionskaskaden Einfluss auf die Zellkommunikation (Gray et al. 2004).

Gemcitabin wird als Prodrug bezeichnet, da es erst intrazellulär durch Phosphorylierung in seine zelltoxisch wirksame Form überführt wird (Abb. 1.7). Hauptsächlich wird dieser Reaktionsschritt von der Deoxycytidinkinase (dCK) katalysiert, der eine Schlüsselfunktion für die klinische Wirksamkeit von Gemcitabin zugesprochen wird (Mini et al. 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Affinität des Enzyms für Gemcitabin nur ein Drittel so groß ist wie die für Cytidin (Mini et al. 2006). Eine untergeordnete Rolle bei der ersten Phosphorylierung spielt die mitochondriale Thymidin Kinase TK2. Deoxycytidinmonophosphatkinase und Deoxycytidindiphosphatkinase katalysieren die weiteren Phosphorylierungsschritte bis hin zum Difluorodeoxycytidintriphosphat (Hilbig et al. 2008), auch Gemcitabintriphosphat genannt.

Die Inaktivierung zu Difluorodeoxyuridin (dFdU) erfolgt katalysiert durch die Deoxycytidineaminase (dCDA) und stellt in vivo den Hauptmechanismus der Metabolisierung dar (Mini et al. 2006). Des Weiteren ist eine Deaminierung von Gemcitabinmonophosphat (dFdCMP) zu Difluorodeoxyuridinmonophosphat durch die dCMP-Deaminase beschrieben und die Rückkonversion von Gemcitabinmonophosphat zu Gemcitabin, katalysiert von der 5'-Nukleotidase (5'-NT) (Mini et al. 2006). Der intrazelluläre Abbau der einzelnen Zwischenstufen wird wiederum inhibiert durch Gemcitabintriphosphat; eine konzentrationsabhängige intrazelluläre Akkumulation und Elimination konnte nachgewiesen werden (Mini et al. 2006).



Abgewandelt und ergänzt nach Mini 2006

**Abb. 1.7** Aufnahme und intrazellulärer Metabolismus von Gemcitabin (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidin, dFdC). Gemcitabin gilt als 'Prodrug' und wird durch enzymatisch katalysierte Phosphorylierung im Zellplasma in seine aktive Form, Gemcitabintriphosphat, überführt. Nur so ist die Aufnahme in den Nukleus und die Inkorporation in die DNA möglich, wodurch die DNA-Polymerase gehemmt wird.

Nach der Phosphorylierung wird Gemcitabintriphosphat wie ein physiologisches Pyrimidintriphosphat in den Zellkern aufgenommen und dort von der DNA-Polymerase bei der DNA-Replikation in den DNA-Strang inkorporiert. Nach Anfügen einer weiteren Base kommt es zur Blockade der DNA-Polymerase und letztlich zum Einzelstrangbruch (Mini et al. 2006). Durch die Reparaturmechanismen wie der Korrekturlese-Funktion der DNA-Polymerase wird Gemcitabin nicht erkannt, so dass die Replikation irreversibel gestoppt wird (Hilbig et al. 2008). Darüber hinaus beeinflusst Gemcitabin noch eine Reihe weiterer intrazellulärer an den Zellzyklus geknüpfte Mediatoren, welche hier nicht explizit besprochen werden. Für einen Überblick sind diese in Abb. 1.7 dargestellt. Insbesondere für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome und Adenokarzinome des Pankreas wird auf eine durch Gemcitabin induzierte Aktivierung von Caspasen hingewiesen, die die Apoptose steuern (Mini et al. 2006).

### **1.2.2 Resistenzentwicklung**

Die Resistenzentwicklung gegen Gemcitabin wird noch erforscht. Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Betrachtung der Transporter, da Gemcitabin als hydrophiles Molekül die Zellmembran nicht passiv überwinden kann (Mackey et al. 1998) sowie den am Metabolismus beteiligten Enzymen (Mini et al. 2006). Von gesteigertem Interesse sind zudem Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, die als Ursache für Resistenzentwicklungen unter Chemotherapie identifiziert wurden (Adachi et al. 2009).

Da bislang keine Kreuzresistenzen bekannt sind, eignet sich Gemcitabin zur Kombinationstherapie mit anderen Zytostatika (Mini et al. 2006); Erprobungen diverser Kombinationen befinden sich bereits in Phase-III-Studien (Hilbig et al. 2008).

Als zusätzlicher indirekter Resistenzmechanismus wird die schlechte Perfusionssituation von Pankreastumoren betrachtet (Schneider und Schmid 2005). Auf diese Weise gelangt bei einer systemischen Chemotherapie nur wenig Wirkstoff in das Tumoreal. Durch Anwendung von regionaler Hyperthermie kann die Perfusion allerdings gesteigert und für Chemotherapeutika zugänglich gemacht werden (Issels 2008).

Die Rolle insbesondere der regionalen Hyperthermie in Hinblick auf die Empfindlichkeit von Tumorzellen in Verbindung mit Gemcitabin wird in Kapitel 1.3 diskutiert.



### **1.3        HYPERTHERMIE**

Es werden anhand von technischen Modalitäten verschiedene Formen der Hyperthermie unterschieden (Hildebrandt et al. 2002):

- lokale/interstitielle Hyperthermie
- Regionale Hyperthermie
- Ganzkörperhyperthermie
- Hypertherme Perfusion (z.B. einzelner Körperteile)
- Hypertherme peritoneale Perfusion

Auf verschiedene Weise wird entweder eine Körperregion bei lokalisierten Tumoren beziehungsweise der gesamte Körper bei systemischen Erkrankungen erwärmt. Allen Verfahren gemeinsam ist, dass es sich um eine additive Therapieoption zur konventionellen Tumorthherapie handelt (Wust et al. 2002). In diesem Zusammenhang wird von „Thermosensitisation“ (Issels 2008) gesprochen.

Abhängig von der applizierten Temperatur, werden verschiedene Reaktionen in vivo beobachtet: unter 40°C wird keine Tumorzerstörung beobachtet, wohl aber erhöhte Spiegel so genannter Hitzeschockproteine (Issels 2008). Bei ‚milder Hyperthermie‘ zwischen 41°C und 43°C findet eine indirekte Tumorzerstörung durch Veränderung der Zellarchitektur und der erhöhte Durchblutung des Tumorgewebes statt (Hildebrandt et al. 2002; Issels 2008). Temperaturen über 43°C hingegen vermindern den Blutfluss im Tumorgewebe, wodurch ein Sauerstoff- und Nährstoffmangel hervorgerufen wird, welcher letztlich zu Apoptose oder Nekrose führt (Hildebrandt et al. 2002).

Das komplexe Zusammenspiel verschiedener durch Hyperthermie hervorgerufener Reaktionskaskaden ist nach wie vor noch nicht gänzlich erforscht und bleibt oft spekulativ.

Die bei der Anwendung der regionalen Hyperthermie erreichten Temperaturen im Gewebe liegen bei 41 – 42°C (Issels 2008), so dass für die klinische Umsetzung von thermosensitiven Liposomen Systeme betrachtet werden müssen, die bei milder Hyperthermie wirksam sind.

#### **1.3.1        Hyperthermie und Chemotherapie**

In einigen präklinischen und klinischen Studien wurde bereits ein Synergismus zwischen zytostatischen Wirkstoffen und Hyperthermie beschrieben (Bull 2007, Bull 2008). Als Grund hierfür werden verschiedene Mechanismen angenommen: vermehrte Aufnahmen und Steigerung der zytotoxischen Potenz des Chemotherapeutikums, verminderte Reparaturkapazität der durch das Chemotherapeutikum geschädigten Zellen und selektive Zerstörung von Tumorzellen durch hyperthermieinduzierte Hypoxie (Issels 2008, Bree 1999).

Im Fall von Cisplatin kann durch Hyperthermiebehandlung sogar eine Resensibilisierung von zuvor resistenten Zellen beobachtet werden (Hettinga et al.1997).

Erste klinische Empfehlungen für die Kombination von Gemcitabin und Hyperthermie gibt es für Patienten mit Pankreaskarzinom in einer Radiochemotherapiestudie (Oghuri et al. 2008), sowie einer laufenden Phase-III-Studie (EORTC 62961/ESHO-RHT 95 intergroup phase III study; Lindner et al.2005). Im März 2012 wurde eine randomisierte Phase-III-Studie begonnen, die den Einfluss der hyperthermen Gemcitabin/Cisplatin-Therapie auf das progressionsfreie Überleben gegenüber der Standard Gemcitabinmonotherapie in der adjuvanten Situation untersucht (EudraCT-Nummer: 2008-004802-14).

### **1.3.2 Thermosensitive Liposomen und Hyperthermie**

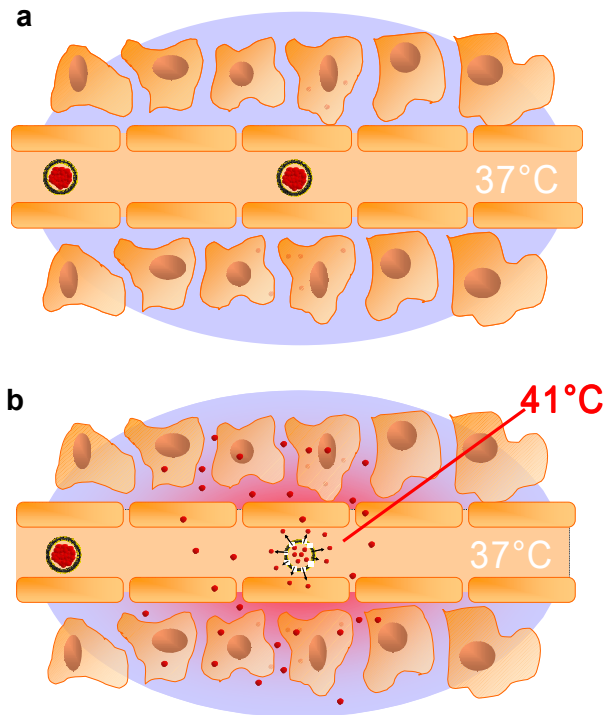
Bei der Verwendung thermosensitiver Liposomen als Wirkstofffähren werden die Vorzüge der milden Hyperthermie genutzt. Dabei können grundsätzlich zwei Orte der Wirkstofffreisetzung unterschieden werden: zum einen die intravasale Freisetzung im erwärmten Tumoreal und zum anderen die Freisetzung aus bereits in das Gewebe gewanderten (extravasalen/interstitiellen) TSL. Die Extravasation der Vesikel findet bevorzugt in den ‚löchrigen‘ Epithelien im Tumorgebiet statt (Ponce et. Al. 2006) was durch die Erwärmung noch verstärkt wird (Koning et al. 2009). Auf diese Weise können Zytostatika gezielt im Tumorgebiet akkumulieren, während gesundes Gewebe weitgehend geschont werden kann (Ponce et al. 2006).

In vivo Versuche mit liposomalem Doxorubicin zeigten bereits eine Reduktion der unerwünschten Nebenwirkungen wie Myelosuppression und Alopezie bei gleichzeitig höheren Wirkstoffdosen im Tumorgebiet (Ponce et al. 2006). Diese Erkenntnisse sollen nun auch für Gemcitabin genutzt werden.

Während bei den nicht-thermosensitiven Liposomen die Verbesserung der Extravasation unter zu Hilfenahme der Hyperthermie im Vordergrund steht, ist das Ziel bei der Verwendung von thermosensitiven Liposomen in Verbindung mit der Hyperthermie die intravasale Freisetzung im Tumorgebiet. Dadurch ist der Wirkstoff schneller bioverfügbar und affektiert sowohl die Endothelzellen als auch die Tumorzellen (Koning et al. 2012).

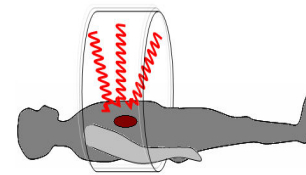
Darüber hinaus ist auch denkbar, vor der Applikation thermosensitiver Liposomen durch Hyperthermie die Extravasation zu verbessern und nach der interstitiellen Anreicherung die Wirkstofffreisetzung in einer zweiten Hyperthermiebehandlung zu triggern. Hierfür fehlen zurzeit noch klinische Daten (Koning et al. 2010).





**Abb. 1.8** - Prinzip der intravasalen Wirkstofffreisetzung mittels TSL und lokaler Hyperthermie.

**a** - Bei physiologischer Körpertemperatur sind die TSL stabil bei der Gefäßpassage  
**b** - Durch lokale Erwärmung auf 41°C bis 42°C erfolgt die intravasale Wirkstofffreisetzung im erwärmten Gewebe. Eine milde Temperaturerhöhung kann erreicht werden durch lokale Hyperthermie oder Ultraschall (HIFU, high intensity focused ultrasound).



### 1.3.3 Hitzeschockprotein HSP70 und Gemcitabin

In der Literatur finden sich kontroverse Angaben zur Rolle des Hsp70 hinsichtlich des Einflusses auf die Modulation der Sensibilität maligner Zellen für den Antimetaboliten Gemcitabin. Die Hsp70 Produktion wird intrazellulär als Reaktion auf thermalen Stress zum Schutz vor Denaturierung erhöht. Gelingt es der Zelle nicht, auf diese Weise aufgrund zu großer Schädigung den Zelltod abzuwenden, kommt es entweder zum programmierten Zelltod (Apoptose) oder zur Nekrose. Gelangt Hsp70 in den extrazellulären Raum, wirkt es immunstimulierend (Issels 2008).

Hsp70 überexprimierende Zellen zeigen eine geringere Sensitivität für Gemcitabin und sogar die Fähigkeit der erneuten Zellproliferation im Anschluss an eine Behandlung mit Gemcitabin (Sluitz et al. 1996). Eine Hsp70 Überexpression ist allerdings nicht die Regel und wird in den meisten Fällen durch exogene Faktoren getriggert (Hildebrandt et al. 2002).

Gemcitabin kann eine gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB hervorrufen (Adachi et al. 2009), welcher in der Konsequenz eine Gemcitabinresistenz, Zellproliferation, Angiogenese und Anti-apoptose nach sich zieht (Adachi et al. 2009). Hyperthermieinduzierte Bildung von Hsp70 wiederum inhibiert die NF-κB-Bildung und verstärkt so die Zytotoxizität von Gemcitabin.

## **1.4 DAS PANKREASKARZINOM**

### **1.4.1 Pankreaskarzinome aus klinischer Sicht**

Das Pankreaskarzinom ist in Mitteleuropa auf Platz drei der häufigsten gastrointestinalen Tumoren im Erwachsenenalter nach dem Colon- und dem Magenkarzinom und trifft mehr Männer als Frauen. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 6. und 8. Lebensjahrzehnt. Die wichtigste beschriebene Noxe bei 30% der dukталen Pankreaskarzinome ist Tabakrauch. Darüber hinaus sind hereditäre Syndrome bekannt, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen. Beispiele hierfür sind das Peutz-Jeghers-Syndrom (Polyposis des Dünn- und Dickdarms mit Melaninflecken an Lippen und Mundschleimhaut), die hereditäre Pankreatitis, das hereditäre nicht-polypöse Colokarzinom (HNPCC) und das familiäre Pankreaskarzinom (Herold 2009). Bei diesen hereditären Formen wurden typische Genmutationen identifiziert (Hahn 2004). Ebenso führt das gehäufte Auftreten einer akuten Pankreatitis zu einem erhöhten Entartungsrisiko im Sinne eines Adenokarzinoms des Pankreas (Grapin-Button 2005).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind nur etwa 20% der Pankreaskarzinome noch auf das Pankreas begrenzt. Über 40% der Patienten zeigen bereits eine lokoregionäre Ausbreitung, vor allem in die Leber, das angrenzende Colon, die Milz, sowie die Nieren und 40% sind bereits metastasiert. In 35% der Patienten findet sich bereits eine Peritonealkarzinose, oft einhergehend mit Aszites (Kelly 1995, Herold 2009).

Die Trias aus einer kaum möglichen frühzeitigen Diagnostizierbarkeit aufgrund oftmals über lange Zeit bestehender Symptomarmut und -fehldeutung, wenig suffizienten Therapiemöglichkeiten sowie einer im Allgemeinen schlechten Prognose sind Kennzeichen des Pankreaskarzinoms (Herold 2009, Schneider und Schmid 2005).

### **1.4.2 Einteilung der Pankreasneoplasien**

Benigne Neoplasien und solche mit geringem Entartungspotenzial, wie Zysten, Pseudozysten und Zystadenome des Pankreas sind relativ selten, sodass eine neu aufgetretene Raumforderung im Bereich des Pankreas primär im Verdacht einer malignen Neubildung steht. Zystische Neoplasien (Zystadenome und Zystadenokarzinome) sind häufig klein und nur langsam progredient, sodass meistens eine kurative, chirurgische Exzision möglich ist (Kelly 1995). Unter 1% entfallen auf die seltenen Neubildungen des endokrinen Systems, wie Insulinome, Glucagonome, Somatostinome oder nicht-funktionale neuroendokrine Tumoren (Kelly 2009).

Über 90% der Pankreaskarzinome sind epithelialen Ursprungs und können nach histologischen Aspekten, sowie nach ihrer Lokalisation eingeteilt werden (Riede, Werner,

Schaefer 2004, Cho et al. 2011). Über 70% der malignen Veränderungen befinden sich im Kopfteil, danach folgt der Korpus vor dem Schwanzanteil und nur in seltenen Fällen ist die Papilla Vateri betroffen (Müller 2009). Histopathologisch betrachtet stellt das duktales Adenokarzinom mit über 90% die häufigste Entität dar. Andere Formen sind das Azinuszellkarzinom, das Plattenepithelkarzinom, das kleinzellige Pankreaskarzinom, eine szirrhöse und eine anaplastische Form des Pankreaskarzinoms (Müller 2009).

### **1.4.3 Pathogenese des Pankreaskarzinoms**

Wie bei anderen soliden Tumoren, lässt sich für das duktales Pankreaskarzinom ein Tumorprogressionsmodell aufstellen, das das Zusammenspiel aus genetischen und epigenetischen Veränderungen, die letztlich zur Karzinomentstehung führen, widerspiegelt (Schneider et al. 2003).

In einer Übersichtsarbeit von Schneider und Schmid 2005 ist eine Zusammenstellung über die den Zellzyklus regulatorisch beeinflussenden Faktoren aufgezeigt. Wichtige Eckpunkte bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms sind:

- Zellzyklusderegulation
- Apoptoseresistenz
- Invasion und Metastasierung
- Angiogenese

Der Zellzyklus wird in definierte Phasen ( $G_0$ -,  $G_1$ -, S-,  $G_2$ - und die M- Phase) unterteilt an deren Ende jeweils so genannte ‚Checkpoints‘ liegen, die den Verlauf der Proliferation kontrollieren. Komplexe Veränderungen der Aktivitäten von Tumorsuppressoren wie das Retinoblastomprotein, p53 oder MADH4, sowie die Aktivierung von Onkogenen wie k-RAS führen über vielfältige Signalwege zu einer eingeschränkten bis fehlenden Phasenkontrolle, hauptsächlich am  $G_1$ -Phase-Checkpoint (Schneider und Schmid 2005).

Es wurden darüber hinaus noch diverse Kinasen, wie die MAPK und Transkriptionsfaktoren wie AP1 und NF- $\kappa$ B beschrieben, die allesamt eine Rolle in der sehr vielschichtigen Pathogenese des Pankreaskarzinoms spielen und Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien liefern (Schneider und Schmid 2005).

### **1.4.4 Diagnostik**

Da Frühsymptome oftmals fehlen ist die Diagnosestellung in frühen Stadien selten und oft ein Zufallsbefund, zum Beispiel im Rahmen einer Oberbauchsonographie. Symptome können sein: epigastrische Schmerzen mit Übelkeit, Ikterus bei Pankreaskopfkarzinom mit Obstruktion des Ductus choledochus eventuell in Verbindung mit einem positiven

Courvoisier-Zeichen (=indolente, prallelastisch palpable Gallenblase + Ikterus), Gewichtsverlust bis zur Anorexie in Verbindung mit anderen B-Symptomen (Fieber und Nachtschweiß), endokrine Insuffizienz wie eine Erstmanifestation eines Diabetes mellitus, sowie paraneoplastische Symptome wie Thromboseneigung und Thrombophlebitis migrans (Herold 2009).

Wichtige diagnostische Methoden sind:

- Sonographie (US) und Endosonographie (Endo-US)
- Multi-Detektor Computertomographie = MDCT, eine Weiterentwicklung des Spiral-CTs mit geringer Schichtdicke und hoher Auflösung (Grenacher und Klauss 2009) und Angio-CT
- Magnetresonanztomographie (MRT)
- Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) mit Kontrastmittel und der Möglichkeit der Probenentnahme
- Tumormarker: CA 19-9 und CA 50 (ausschließlich Verlaufkontrolle!)
- Diagnostische Laparotomie (v. a. im Rahmen vom Staging angewendet: Nachweis von oberflächlichen Lebermetastasen und einer Peritonealkarzinose)
- Weitere spezifische Verfahren, zum Beispiel molekulardiagnostische Diagnostik bei Verdacht auf hereditäre Formen des Pankreaskarzinoms

Ubiquitär verfügbar und am wenigsten invasiv ist die Sonographie. Präziser ist hier noch die Endosonographie, die das Erkennen von Tumorherden ab 1cm Durchmesser ermöglicht (Herold 2009). Allerdings sind diese Methoden von der Expertise des Untersuchers abhängig und daher schwer objektivierbar (Kelly 1995).

Mittel der Wahl zur initialen Abklärung von Raumforderungen im Pankreas, Staging, Feststellen der Operabilität und Verlaufskontrolle bei neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie ist die MDCT (Grenacher und Klauss 2009). 70 bis 100% aller Pankreastumoren können mittels MDCT mit einer Sensitivität von 89% und einer Spezifität von 99% diagnostiziert werden. Die Resizierbarkeit kann mit einer Sensitivität von 94% und einer Spezifität von 89% angegeben werden, wobei Aussagen zur anatomischen Beziehungen des Tumors zum umliegenden Gewebe und insbesondere zum vaskulären System, in schwierigen Fällen auch mithilfe von 3D-Rekonstruktion gemacht werden können. Die Resizierbarkeit eines Pankreaskarzinoms hat wesentlichen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Grenacher und Klauss 2009).

Meist kann die Entität des Tumors ebenfalls mittels MDCT bestimmt werden; ist allerdings eine genau Abgrenzung zwischen inflammatorisch bedingten von tumorösen Veränderungen nicht sicher möglich, kann bei einer ERCP ein Biopsat gewonnen und histopathologisch

untersucht werden. Da diese Untersuchung invasiv, risikoreich und nicht bei jedem Patienten möglich ist, wird sie nicht mehr standardmäßig bei jedem Verdacht auf Pankreaskarzinom durchgeführt (Cho 2011, Kelly 1995).

MRT-Untersuchungen sind weitgehend durch das MDCT abgelöst, da beide Methoden hinsichtlich Sensitivität und Spezifität vergleichbar sind (Grenacher und Klauss 2009). Lediglich bei Kontrastmittelunverträglichkeit oder stark eingeschränkter Nierenfunktion ist ein MRT indiziert (Kelly 1995).

#### **1.4.5 Staging**

Das Staging ist wichtig zur Therapieplanung und Prognosestellung. Anbei eine nach Kelly<sup>o</sup>1995 modifizierte Einteilung unter zu Hilfenahme der TNM-Klassifikation:

Stadium I: T 1 – 2, N 0, M 0 = Tumor beschränkt sich auf das Pankreas

Stadium II: T 2/3, N 0, M 0 = lokoregionäre Ausbreitung (Infiltration des Nachbargewebes)

Stadium III: T 1 – 3, N 1, M 0 = regionaler Lymphknotenbefall

Stadium IV: T 1 – 4, N 0 – 1, M 1 = Fernmetastasen nachweisbar

#### **1.4.6 Therapieansätze und 5-Jahres-Überlebensraten**

In den Stadien I bis III wird eine R0 oder R1-Resektion angestrebt. Dazu wird meist eine partielle Doudenopankreatektomie nach Kausch-Whipple oder alternativ die pyloruserhaltende Doudenopankreatektomie durchgeführt. Allerdings ist nur bei 15 – 20% der Patienten eine Resektion mit kurativer Intention möglich. Anschließend erfolgt immer eine adjuvante Chemotherapie oder Radiochemotherapie. Das 5-Jahres-Überleben liegt dann bei 10 bis 20 % (Ying et al. 2012, Herold 2009).

Über 80% der Patienten werden in einem metastasierten, nicht kurativ resizierbaren Stadium diagnostiziert. Das 5-Jahres-Überleben in der Palliativsituation liegt bei 0%; das mittlere Überleben beträgt in diesem Fall weniger als 20 Monate (Ying et al. 2012, Herold 2009, HEAT clinical study protokoll: EudraCT-Nummer: 2008-004802-14).

Die Anwendung von Gemcitabin in der Monotherapie oder auch in Kombination mit anderen Zytostatika stellt die bislang wirkungsvollste Chemotherapie dar (Hilbig et al. 2008) allerdings unter Inkaufnahme diverser zytostatikaassoziierter Nebenwirkungen, wie Knochenmarkdepression und Alopecie, die nicht nur körperliche, sondern auch psychische Strapazen für den Patienten bedeuten. Daher besteht großes Interesse an der Möglichkeit der zielgerichteten Chemotherapie, wie sie mithilfe von TSL erreicht werden kann.

Jüngste Publikationen suggerieren die Applikation von Gemcitabin nach einem fixed-dose-rate-Protokoll. Kulke verglich 2009 das Outcome nach Infusion von 2200mg/m<sup>2</sup> Gemcitabin

über 30 min (Standardschema) mit einer fixed-dose-rate-Infusion von 1500mg/m<sup>2</sup> Gemcitabin über 150 min (10mg/m<sup>2</sup>/min) und stellte eine mediane Überlebenszeit von 5 Monaten nach Standardschema einer Überlebenszeit von 8 Monaten nach fixed-dose-rate-Schema gegenüber. Allerdings traten unter dem neuen Schema eine erhöhte Hämatotoxizität auf (Ying et al. 2012). Millela et al. zeigten 2010 eine abgewandelte Form der fixed-dose-rate-Infusion, indem sie die applizierte Dosis auf 1000mg/m<sup>2</sup> reduzierten und darunter weniger hämatotoxische Nebenwirkungen bei gleich bleibendem Outcome beobachteten.

Diese Erkenntnisse gilt es nun auch für die Anwendung von liposomalen Gemcitabin zu beachten.

## **1.5        AUFGABENSTELLUNG**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einschluss des Pyrimidinanalogons Gemcitabin in thermosensitive Liposomen. Durch verschiedene Testverfahren soll untersucht werden, ob sich der Wirkstoff für die liposomale Applikation eignet. Es soll eine chemische Charakterisierung sowie die Etablierung einer geeigneten Zellkultur für die Folgeversuche erfolgen. Hauptaugenmerk wird hier vor allem auf die Pankreaskarzinomzelllinien gelegt.

Trotz radikaler chirurgischer Intervention, Bestrahlung und systemischer Chemotherapie liegt das mediane Überleben bei nur 11 bis 20 Monaten; die Patienten erliegen allerdings meistens den systemischen Folgen des Pankreaskarzinoms (HEAT clinical study protocol; S. van der Sluis). Daher ist es erstrebenswert eine geeignete systemische Therapiemethode zu entwickeln, die sowohl die Tumorlast als auch die nebenwirkungsbedingte psychische und körperliche Last der Patient verringert.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIALIEN

#### 2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die Chemikalien von der Firma Karl Roth GmbH, Karlsruhe bezogen. Zur pH-Einstellung wurden 1 M Natronlauge und 0,1 M Salzsäure verwendet. Des Weiteren wurde bei allen Versuchen bidestilliertes Wasser verwendet (fortan nur als aqua bidest/H<sub>2</sub>O erwähnt).

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure, Biomol, Hamburg
Acetonitril CH <sub>3</sub> CN, ACN	HPLC Far UV/Gradient Grade J.T. Baker, Deventer
Methanol	'Baker HPLC Analyzed', J.T. Baker, Deventer
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan, Merck, Darmstadt
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Triton® X-100	Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 2.1.2 verwendete Lösungen

Histidin-Puffer pH = 6,4	20 mM L-Histidin 150 mM Natriumchlorid
HN-Puffer pH = 7,4 bzw. 7,8 bzw. 8,0	20 mM HEPES 150 mM Natriumchlorid
Citratpuffer pH = 4,0	300 mM Zitronensäure-Monohydrat Merck KGaA, Darmstadt
Carboxyfluorescein (CF)	100 mM wässrige Lösung, pH 7,2, Sigma, Steinheim
5% Glucoselösung, 'ungepuffert'	
5% Glucoselösung pH ~ 7,4	
0,9% Natriumchloridlösung	154 mM Natriumchlorid



Säulenmaterial	10 g Sephadex® G 50 Sigma-Aldrich, Steinheim 0,9% Natriumchloridlösung
Tris/NaCl 0,9% -Puffer pH 8,0	10 mM Tris
Methanol/ Acetonitril-Lösung	CH <sub>3</sub> OH/ ACN 9:1 (vol/vol)
„Lösung I“	360 mM 99,8% Schwefelsäure Merck KGaA, Darmstadt
„Lösung II“	2,4 mM Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat 120 µl Triton® X-100 Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich, Steinheim
„Standard“ (Phosphatbestimmung)	0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 2.1.3 Zellkultur

Folgende Materialien für die Zellkultur wurden von Biochrom AG, Berlin bezogen:  
DMEM Kulturmedium mit 3,7g/l, NaHCO<sub>3</sub> High Glucose; PBS (phosphate buffered saline), Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA), MEM Vitamine 100x, Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), Trypsin/EDTA 10x, Fetales Kälberserum (FCS).

Kulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Nunc, Roskilde Site, Roskilde, Dänemark
Falconröhrchen	15ml und 50ml, BD Franklin Lakes, NJ, USA
Einwegpipetten, Pipettenspitzen	Nunc, Roskilde, Dänemark / epT.I.P.S. Eppendorf
96-well-Platten	Microtest™ Primaria™ Flat Bottom Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellschaber	TPP Cell Scraper 24cm, CH
Kryoröhrchen CryoTube™ Vials	Nunc, Roskilde, Dänemark
70% Isopropanol	
Myco Alert® Reagent	} Lonza Rockland, Inc., Rockland USA
Myco Alert® Substrat	
WST-Reagenz	Cell Proliferation Reagent WST-1 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

## 2.2 METHODEN TEIL I

### HERSTELLUNG UND IN VITRO ANALYTIK VON GEMCITABIN-TSL

#### 2.2.1 Qualitativer und quantitativer Nachweis von dU und Gemcitabin

##### UV/VIS Spektrometrie von dU und Gemcitabin

Das 2'-Deoxyuridin wurde von der Firma Sigma Chemical CO., USA bezogen und liegt in Pulverform vor. Es wurde eine Stammlösung in aqua bidest mit  $c = 50 \text{ mg/ml}$  hergestellt und bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert. Ausgehend von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt. Für die Messung wurden Lösungen mit den Konzentrationen  $1 \times 10^{-1} \text{ mg/ml}$  bis  $1 \times 10^{-9} \text{ mg/ml}$  verwendet.

Um das Verhalten in anderen Lösungsmitteln als aqua bidest zu testen, wurden ausgehend von der Stammlösung gleiche Verdünnungsreihen mit Histidin-Puffer,  $\text{pH} = 6,4$ , 300mM Citrat,  $\text{pH} = 4$  und HN-Puffer,  $\text{pH} = 7,4$  hergestellt.

Gemcitabin wurde als eine von der hausinternen Apotheke angesetzte Lösung mit der vorgegebenen Konzentration  $c = 38 \text{ mg/ml}$  bezogen. Das GemZar® Pulver für Infusionslösungen des Herstellers Lilly Deutschland GmbH ist ein für die Chemotherapie im Menschen zugelassenes Zytostatikum. Anlog zum Vorversuch mit dU wurde eine Verdünnungsreihe von  $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mg/ml}$  bis  $c = 1 \times 10^{-1} \text{ mg/ml}$  erstellt und vermessen.

2'-Deoxyuridin	Stammlösung 50 mg/ml
GemZar® 38 mg/ml	Gemcitabin Stammlösung Lilly GmbH Deutschland
Histidin-Puffer	$\text{pH} = 6,4$
Citrat-Puffer	300mM, $\text{pH} = 4$
HN-Puffer	$\text{pH} = 7,4$
Acetonitril	
Methanol/ Acetonitril-Lösung	$\text{CH}_3\text{OH}/ \text{ACN } 9:1 \text{ (vol/vol)}$

#### Materialien

Küvetten	Präzisionsküvetten aus Quarzglas Schichttiefe 10,00 mm, Hellma
----------	---

#### Geräte

UV/VIS Photospektrometer DU 640	Beckmann
---------------------------------	----------

Alle Absorptionsmessungen wurden mit dem UV/VIS Spektrometer DU 640 von Beckmann durchgeführt; Geräteeinstellungen wie folgt: Startwellenlänge  $\lambda = 190 \text{ nm}$ , Endwellenlänge  $\lambda = 400 \text{ nm}$ , Scanspeed  $240 \text{ nm/min}$ , Intervall  $35,00 \text{ sec}$ .

Die Lösungen wurden jeweils in aufsteigenden Konzentrationen gemessen. Die Küvetten wurden vor jeder Messung geleert und mit aqua bidest gespült.

Gemcitabinproben mit festgelegter Konzentration wurden zusätzlich noch in Acetonitril und in Methanol/Acetonitril 9:1 (vol/vol) gelöst gemessen. Diese Lösungsmittel kommen bei der Wirkstoffbestimmung und im Rahmen der Probenvermessung bei den Temperaturkurven zum Einsatz.

### **2.2.2      Thermostabilität von dU und Gemcitabin bei Hyperthermie**

Bei der Herstellung, Beladung sowie beim Einsatz von Liposomen werden Temperaturen bis 60°C eingesetzt. Daher ist es von Bedeutung, dass der Wirkstoff diese Temperaturen unbeschadet übersteht.

Temperaturerhöhungen können die Stabilität von Molekülen verändern. Des Weiteren haben pH und Puffereigenschaften der verwendeten Lösungen Einfluss auf die intra- sowie intermolekularen Bindungen.

#### Materialien

HN-Puffer	pH = 7,4
Citrat-Puffer	pH = 4
0,9% NaCl	ungepuffert, pH ~ 7
5%ige Glucoselösung	ungepuffert, pH ~ 5,3

#### Geräte

Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV/VIS Spektrometer	Beckmann DU® 640

Die Konzentration für die Messküvette wurde auf 0,04 mg/ml für dU und 0,038 mg/ml für Gemcitabin festgelegt. Die jeweiligen Stammlösungen wurden mit aqua bidest, Citrat-Puffer, HN-Puffer, 0,9% NaCl-Lösung oder 5%iger Glucoselösung verdünnt und eine Stunde bei 60°C inkubiert. Die Messung des Absorptionsspektrums erfolgte anschließend, wobei die vorher für aqua bidest festgelegten Maxima für die jeweiligen Verdünnungsmittel nochmals kontrolliert wurden um eventuelle Einflüsse des Verdünnungsmediums auf die Absorptionswellenlänge ausschließen zu können.

### 2.2.3 Temperaturstabilität von Gemcitabin in fetalem Kälberserum (FCS)

In vivo Bedingungen werden unter zu Hilfenahme von fetalem Kälberserum simuliert. Auch in diesem Medium soll eine Temperaturstabilität von Gemcitabin gezeigt werden. Dabei interessiert hier die Stabilität bei 37°C (entsprechend der menschlichen Körpertemperatur) und bei 42°C (Hyperthermiebedingungen im menschlichen Gewebe).

Ethanol/Acetonitril-Lösung

CH<sub>3</sub>OH/ACN 9:1 (vol/vol)

GemZar® 38 mg/ml

Gemcitabin Stammlösung  
Lilly GmbH Deutschland

#### Geräte

Thermomixer compact

Eppendorf, Hamburg

UV/VIS Spektrometer

Beckmann DU® 640

Zentrifuge 5415C

Eppendorf

Eine Gemcitabinlösung mit  $c = 1,9 \text{ mg/ml}$  wird angesetzt und 10 µl sowohl mit 40 µl aqua bidest als auch mit 40 µl FCS zusammengegeben. Die Probe mit aqua bidest soll als Kontrolle dienen. Pro Probe werden zwei Aliquots angelegt; ein Aliquot wird vor der Inkubation im UV/VIS Spektrometer vermessen und anschließend verworfen, während die zugehörige zweite Probe eine Stunde bei 37°C respektive bei 42°C inkubiert wird. Danach werden je 1000 µl CH<sub>3</sub>OH/ACN 9:1 (vol/vol) zu den Proben gegeben. Bevor die Proben in die Messküvetten gegeben werden, müssen sie bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand ohne Verletzung des bei FCS ausfallenden Pellets abgenommen werden.

Als BLANK werden Lösungen verwendet, die anstelle des Wirkstoffs gleiche Mengen aqua bidest enthalten. Die Inkubation und Aufbereitung erfolgt analog zu den wirkstoffhaltigen Proben.

### 2.2.4 pH-Metrie

#### Materialien

pH-Indikationsstäbchen pH 5,0 – 10,0

Neutralit® Merck, Darmstadt

pH-Messelektrode SenTix 41

WTW inoLab, Weilheim

Konzentration der dU-Lösung: 50 mg/dl; Verdünnung mit aqua bidest.

Zunächst erfolgt eine Eingrenzung des pH Bereichs mittels Indikationsstäbchen, hernach die Bestimmung des genauen pH mit der pH-Messelektrode SenTix 41.

### 2.2.5 Haltbarkeit von Gemcitabin

#### Materialien

GemZar® 38 mg/ml

Gemcitabin Stammlösung  
Lilly GmbH Deutschland

#### Geräte

UV/VIS Spektrometer

Beckmann DU® 640

Die Verwendbarkeit der fertigen Gemcitabinlösung wird von der Apotheke vorgegeben. Nichts desto Trotz kann die Haltbarkeit über der empfohlenen Verwendbarkeit liegen. Daher wurde in wöchentlichen, später monatlichen Abständen Kontrollmessungen mit einer Probe durchgeführt, die durchgehend bei +4°C gelagert wurde. Die Messungen erfolgen jeweils in aqua bidest; die Geräteeinstellungen entsprechen denen unter 2.1.1.

### 2.2.6 Präparation thermosensitiver Liposomen

#### Materialien

DPPC, DSPC

Genzyme Pharmaceuticals LLC, Liestal, CH

DPPG<sub>2</sub>

synthetisiert von Prof. Eibl,  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische  
Chemie, Göttingen

Chloroform

Merck KGaA, Darmstadt

#### Geräte

Präzisionswaage

Precisa 205 A SCS

Rotationsverdampfer

Laborota 4001, Heidolph

Thermobarell Extruder

LIPEX™

Handbetriebener Extruder

Sonderanfertigung des Max-Planck-Instituts  
für biophysikalische Chemie

Die Lipide liegen in Pulverform vor und werden bei +4°C gelagert. Vor dem Öffnen der Behälter müssen sie auf Raumtemperatur gebracht werden um Wasserkondensationen zu vermeiden, was in der Folge zu einer Verfälschung des Lipidgewichts führen würde.

Das Einwiegen erfolgt für jedes Lipid getrennt in einen Glaskolben; anschließend werden die Lipide in 20 mL Chloroform gelöst und in zuvor errechneten Anteilen in einen Rundkolben zusammen pipettiert. Durch Schwenken des Kolbens werden die Lipidlösungen gut miteinander vermengt. Mit Hilfe des Rotationsverdampfers wird nun in drei Schritten das Lösungsmittel entfernt: zunächst wird die Lipidmischung bei einem Unterdruck von 350 mbar im Wasserbad bei 40°C für etwa 60 min rotiert bis kein Lösungsmittel mehr verdampft und sich ein homogener Lipidfilm ausgebildet hat. Durch Temperaturerhöhung auf 60°C und verringern des Drucks auf 150 mbar für weitere 60 min und schließlich 40 mbar

für etwa 120 min werden eventuell vorhandene Lösungsmittelreste vollständig entfernt. Eine Lagerung des Lipidfilms ist unter Licht- und Sauerstoffausschluss im Exsikkator möglich.

Die Hydratisation des Lipidfilms erfolgt mit der jeweils gewünschten Lösung (dU-Lösung; 5%-Glucose-Lösung; 0,9% NaCl) bzw. dem gewünschten Puffer (HN-Puffer, pH 7,4; 300 mM Citratpuffer pH 4). Im Wasserbad bei 60°C wird der Kolben so lange rotiert, bis sich der Lipidfilm komplett gelöst hat und eine milchig trübe Dispersion entstanden ist (inhomogene multilamelläre Vesikel, MLV). Schaumbildung ist abhängig von der verwendeten Lösung mehr oder weniger stark zu beobachten.

Im Anschluss erfolgt die Extrusion entweder mittels eines manuell betriebenen Thermobarrel Extruders bei Liposomenmengen < 3mL oder mit dem N<sub>2</sub>-gasdruckbetriebenen LIPEX™ Thermobarrel Extruder. Es wurden durch Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 200 nm in 17 (manuelle Extrusion) bzw. 10 (Gasdruckextrusion) Zyklen extrudiert (unilamelläre Vesikel, SUV), wobei die Lipiddispersion zu keinem Zeitpunkt unter 60°C abkühlen durfte. Die resultierenden Liposomenlösungen wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

### **2.2.7 Umpuffern mittels Säulenchromatographie**

#### Materialien

Sephadex® G 50 Säulenmaterial

Liposomendispersionen

Die Sephadex®-Säulen wurden jeweils frisch gegossen und zum Umpuffern von maximal 1000 µl Liposomendispersion verwendet. Dazu wird Sephadex®-Lösung in mit Glaswolle gestopfte Pasteur-Glaspipetten gegeben bis eine ausreichend hohe Säule erreicht ist; dann wird die Säule 20 bis 30 Minuten mit Puffer equilibriert bevor die Liposomenproben auf die Säulen gegeben werden können. Sobald die Dispersion komplett in die Säule gewandert ist, muss erneut durch Pufferzugabe ein Austrocknen der Säule verhindert werden. Die resultierende trübe Liposom-haltige Lösung wird aufgefangen und aliquotiert. Die Lagerung der Liposomendispersionen erfolgte bei -20°C.

### **2.2.8 Qualitätskontrolle mittels Photonenkorrelations-Spektroskopie**

Die Charakterisierung der Liposomen erfolgte jeweils vor und nach dem Beladen mit Wirkstoff. Größe, Zetapotenzial und Polydispersionsindex (PDI) wurden mit dem Zetasizer Nano von Malvern gemessen. Insbesondere der PDI gilt als Qualitätsmerkmal für die Liposomen und gibt Rückschlüsse auf die Güte des Herstellungsverfahrens. Dabei wurden

die Liposomen für die Größenmessung mit aqua bidest und für die Bestimmung des Zetapotenzials mit 0,9% NaCl verdünnt.

### **2.2.9 Lipidgehaltbestimmung (Phosphatbestimmung)**

Um den Lipidgehalt zu bestimmen bedient man sich einer einfachen, von Eibl et al. 1969 publizierten Methode zur Messung des Phosphatgehaltes einer Lösung; der molare Phosphatgehalt korreliert direkt mit dem Phospholipidgehalt. Die Methode beruht auf einer Komplexbildung von Phosphatgruppen mit Molybdänverbindungen, die photometrisch gemessen werden können.

### **2.2.10 Dünnschichtchromatographie**

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte nach einem im Labor etablierten Protokoll (Hossann et al. 2007).

### **2.2.11 Indirekter Einschluss von CF**

#### Geräte

Fluoreszenzspektrometer

Varian Cary-Eclipse

Ziel war es, eine Alternative zu den bis dato in dieser Arbeitsgruppe angewandten Methoden des Wirkstoffeinschlusses zu erproben und anschließend für die Arbeit mit Gemcitabin zu nutzen.

Dazu wurden gleiche Volumina 100 mM CF und Liposomenlösung bei 42°C und bei 60°C über verschiedene Zeitintervalle von 10 Minuten bis 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde gegen 0,9% NaCl gesäult und eine Phosphatbestimmung der einzelnen Proben durchgeführt.

Die Bestimmung des eingeschlossenen Wirkstoffs erfolgt mittels Fluoreszenzspektroskopie. Dazu werden die Liposomenlösungen zunächst mit 0,9% NaCl 1:50 verdünnt und durch Zugabe von 10%-Triton X-100 sowie 15-minütiger Inkubation bei 45°C die Liposomen aufgelöst. Pro zu untersuchende Probe werden 4 Aliquots erstellt und nach der Inkubation mit NaCl/Tris-Puffer verdünnt. Nach der Inkubation und bis zur Vermessung werden die Proben auf Eis gelagert.

Einstellungen des Fluorimeters: Ex = 493 nm; Em = 513 nm, Verstärkung 625 V

### 2.2.12 Beladen der Liposomen mit Wirkstoff

Direkter Wirkstoffeinschluss: der Wirkstoff wird direkt auf den getrockneten Lipidfilm gegeben und nach oben beschriebener Methode hydratisiert und extrudiert. Diese Methode wurde mit dU-Lösungen erprobt.

Indirekter Wirkstoffeinschluss in vorgefertigte Liposomen mittels Inkubation: nach der Hydratisation des Lipidfilms mit 0,9%-NaCl-Lösung, 5%-Glucose-Lösung, 300 mM Citrat-Puffer pH 4 oder HN-Puffer pH 7,4 wurden die Liposomenlösungen („native“ Liposomen) wie zuvor beschrieben extrudiert und charakterisiert (Phosphatbestimmung, Größe und Zetapotenzial, PDI). Zum Beladen wurden jeweils gleiche Mengen (vol/vol) Liposomenlösung und CF beziehungsweise dU oder Gemcitabin zusammen gegeben und über definierte Zeiträume bei Temperaturen zwischen 37°C und 60°C inkubiert. Anschließend wurde durch umpuffern freier, nicht eingeschlossener Wirkstoff entfernt. Die optimale Konstellation aus den gegebenen Stellgrößen wurde anfangs mit CF untersucht und anschließend mit dU und Gemcitabin durchgeführt.

### 2.2.13 Quantitative Bestimmung des eingeschlossenen Wirkstoffs

#### Materialien

Liposomendispersionen (Gemcitabin-TSL)

Triton X-100

Acetonitril

Kaliumdihydrogenphosphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

#### Geräte

Fluoreszenzspektrometer	Cary Eclipse, Varian
UV/VIS Photometer	Beckmann DU® 640
HPLC	515 Pumpe
	UV Detektor 990E
	Vorsäulenhalter
	Säulenofen
	Waters
	Waters
	WATO 88141, Waters
	Waters

Die tatsächliche Menge des eingeschlossenen Wirkstoffs wurde auf unterschiedliche Weise abhängig von den optischen Eigenschaften des eingeschlossenen Stoffes gemessen: die CF-haltigen Liposomen wurden hierfür mit Triton X-100 Lösung zerstört und das freie CF mittels Fluoreszenzspektrometrie bestimmt (siehe 2.2.11). Die dU und Gemcitabin-haltigen Liposomen mussten aufwendiger aufbereitet werden, da weder dU noch Gemcitabin fluoreszieren. Die Methodik der Probenaufbereitung orientiert sich an Lanz et al. 2007.

Zunächst muss eine Eichgerade erstellt werden; dazu wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt ausgehend von der standardisiert von der Apotheke gelieferten GemZar®-Lösung



mit  $c(\text{Gem}) = 38 \text{ mg/ml}$  und mit aqua bidest verdünnt:  $c(\text{Gem})$  in Messküvette  
→  $0,030 \text{ mg/ml} - 0,015 \text{ mg/ml} - 0,008 \text{ mg/ml} - 0,004 \text{ mg/ml} - 0,002 \text{ mg/ml}$ .

Auf  $10 \mu\text{L}$  Probe (dU-Liposomen oder Gemcitabin-Liposomen) wurden  $400 \mu\text{L}$  Acetonitril gegeben um die liposomalen Strukturen zu zerstören. Anschließend wurden die Proben bei  $14.000 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert. Die resultierenden Lösungen wurden für 2 bis 2,5 Stunden bei  $40^\circ\text{C}$  und  $0,6 \text{ bar}$   $\text{N}_2$ -Begasung eingedampft bis alles Lösungsmittel evaporisiert ist. Abhängig von den Herstellungsmodalitäten (Inhalt der nativen Liposomen) kann sich ein weißliches Präzipitat bilden. Es folgte die Resuspension in  $\text{H}_2\text{O}$  oder HPLC-Laufmittel ( $10 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH } 3,0$ ) und das Messen der UV-Absorption bei  $\lambda = 195 \text{ nm}$ ;  $265 \text{ nm}$ ;  $400 \text{ nm}$  entweder mittels UV/VIS Spektrometer oder mittels HPLC (high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie).

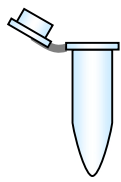
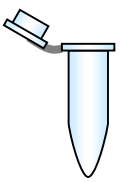
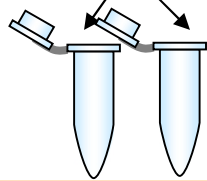
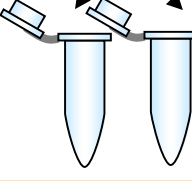
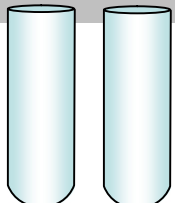

Der zusätzliche Nachweis von freiem dU und Gemcitabin mittels HPLC erfolgte zur Überprüfung der durch obige Methode gewonnen Messwerte.

Die Einstellungen der HPLC waren wie folgt:

- Säule: C18 Bondapak (Fa. Waters),  $15\text{-}20 \mu\text{m}$  Partikelgröße,  $3,9 \times 300 \text{ mm}$
- Vorsäule: Guardpak TM18 (Fa. Waters)
- Laufmittel:  $10 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH } 3$
- Isokratischer Lauf, 60 Minuten,  $1,6 \text{ ml/min}$

#### **2.2.14 Temperaturöffnungskurve der Gemcitabinliposomen**

Die Gemcitabinlösungen werden über einen Zeitraum von 1 Stunde Temperaturen zwischen  $37^\circ\text{C}$  bis  $45^\circ\text{C}$  ausgesetzt und anschließend wie unten beschrieben aufbereitet. Die Wirkstofffreisetzung bei den jeweiligen Inkubationstemperaturen wird schließlich mittels UV/VIS Spektrometrie bestimmt.

Durchführungsprotokoll	
"100%"	"0%" 37°C / 39°C / 40°C / 41°C / 42°C / 43°C / 44°C / 45°C
 <p>50 µL Probe 1000 µL ACN</p> <p><b>gut vortexen</b> Um einen „100%“ Wert zu erhalten, werden die Proben so aufbereitet wie zur Bestimmung des eingeschlossenen Wirkstoffs</p>	<p>[„Probe“ = Gemcitabin-TSL]</p>  <p>50 µL Probe 1000 µL HN-Puffer</p> <p>RT / <b>Inkubation</b> 37°C / 39°C / 40°C / 41°C / 42°C / 43°C / 44°C / 45°C 60 Minuten</p> <p>Die Proben werden wie dargestellt in Eppendorfgefäßen zusammengemischt und die Probe für den „0%“-Wert (RT) bei +4°C gelagert, während die anderen Proben wie beschrieben inkubiert werden.</p>
<b>Eppendorf Zentrifuge 5415C</b> 14.000 rpm / 15 min	<b>SORVALL ROTO SS-34</b> 19.000 rpm / 20 min / 15°C
<p>200 µL Überstand 1000 µL ACN</p> <p>Doppelbestimmung</p> 	<p>200 µL Überstand 1000 µL ACN</p>  <p>Ab diesem Punkt werden alle Proben in gleicher Weise weiterverarbeitet. Nach Zugabe des Acetonitrils müssen die Proben gut gevortext und anschließend zentrifugiert werden.</p>
<b>Eppendorf Zentrifuge 5415C - 14.000 rpm / 15 min</b>	
1000 µL des Überstands in kurze Reagenzgläser füllen	
 <p><b>Bei 40,2°C und 0,6 bar Stickstoff-Begasung über Nacht eindampfen.</b></p>	
Nach dem Eindampfen in 1000 µL H <sub>2</sub> O resuspendieren und in Eppendorfgefäße umfüllen	
<b>Eppendorf Zentrifuge 5415C - 14.000 rpm / 15 min</b>	
in Quarzglasküvetten überführen und messen	
 <p><b>UV/VIS Spektrometrie</b> BLANK: H<sub>2</sub>O</p> <p>}<sub>1</sub> = 195 nm }<sub>2</sub> = 265 nm }<sub>3</sub> = 400 nm</p>	

## 2.3 METHODEN TEIL II - ZELLKULTUR

### Materialien (s.o.)

#### Geräte

Brutschrank	Binder APT.line CB CO <sub>2</sub> -Inkubator
Phasenkontrastmikroskop 40x	Olympus CH
Floureszenzmikroskop	Axiovert 40 CFL, Zeiss
Zentrifuge	Labofuge 400R, Heraeus
Laminar-Flow-Werkbank	Gelaire BSB4
Pipettierhilfe	

### 2.3.1 Zelllinien

MIA PaCa-2 Humanes Pankreaskarzinom

FG Humanes Adenokarzinom des Pankreas, tendenziell nicht metastasierend

L3.6 Humanes Adenokarzinom des Pankreas, tendenziell schnell metastasierend

Die Kultivierung erfolgte in DMEM Medium plus 10% FCS, 1% NEA, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% MEM Vitamine in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (20 ml Kulturmedium) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. MIA-PaCa-2 Zellen sind dabei nicht zwingend auf die Zugabe von NEA und MEM Vitaminen angewiesen. Bei Erreichen der Konfluenz, d. h. bei einem etwa zu 90% dichten Monolayer, wurden die Zellen nach einem festgelegten Standardprotokoll in gleich bleibenden Abständen subkultiviert. Dazu wurde das verbrauchte Medium komplett entfernt, die Kulturen mit PBS-Puffer gewaschen und dann nach Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA weitere 3 min inkubiert. Trypsin spaltet hier enzymatisch die Adhäsionsproteine, wodurch sich die Zellen sowohl vom Flaschenboden als auch voneinander lösen. Nach Zugabe von 8 ml Medium wurden die Zellen in der Kulturflasche gründlich resuspendiert und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Die MIA PaCa-2 Zellen lösten sich dabei komplett selbstständig während die FG Zellen sowie die L3.6 Zellen mittels Zellschaber vom Flaschenboden getrennt werden mussten. Die Zellsuspensionen wurden daraufhin für 2 min bei 900 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in definierten Verhältnissen von 1:5 beziehungsweise 1:10 je nach Wachstumsgeschwindigkeit auf 20 ml erwärmtes Medium in eine neue Kulturflasche gegeben.

Durchschnittlich lieferten die Kulturflaschen folgende Zellmengen:  $0,9 \times 10^6$  MIA PaCa-2-Zellen,  $1,5 \times 10^6$  FG-Zellen und  $1,8 \times 10^6$  L3.6-Zellen.

### **2.3.2 Zellzahlbestimmung**

#### Material und Geräte

Neubauer Zählkammer	Neubauer improved, 0,100mm Tiefe, 0,0025mm <sup>2</sup> HHH Germany
Phasenkontrastmikroskop 40x	Olympus CH

Zellzahlbestimmungen wurden grundsätzlich durchgeführt vor der Kryokonservierung sowie vor allen Versuchen, in denen definierte Zellmengen ausgesät wurden. Dazu wird ein Tropfen der zuvor gut mittels Pipette passagierten Zellsuspension unter das Objektglas der Neubauer Zählkammer gegeben. Per definitionem gilt, dass die gezählte Zellzahl (gemittelter Wert aus mindestens 2 Zählfeldern) der Zellzahl in  $0,1 \text{ mm}^3 \Rightarrow 0,1 \text{ } \mu\text{l}$  entspricht. Daraus errechnet man die Zellen/ml. Da FG Zellen und L3.6 Zellen zur Verklumpung neigen erfolgte die Resuspension zusätzlich mithilfe einer feinlumigen Pipettenspitze.

### **2.3.3 Kryokonservierung**

#### Material

Dimethylsulfoxid (DMSO)  
Fetales Kälberserum (FCS)  
Kryoröhrchen CryoTube™  
Einfriermedium: FCS + 10% DMSO

#### Geräte

-80°C Tiefkühlschrank  
N<sub>2</sub>-Tank  
Nalgene 1C Freezing Container

Sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen sollte zügig gearbeitet werden, da DMSO im flüssigen Aggregatzustand zytotoxisch wirkt. DMSO ist ein membrangängiges organisches Lösungsmittel und unterbindet beim Einfrieren die Bildung von kristallinen Strukturen sowohl im Zytoplasma als auch außerhalb der Zelle. Auf diese Weise wird eine mechanische Schädigung der Zellen durch den Konservierungsprozess verringert.

#### **2.3.4 Einfriervorgang**

Zellen sollten nur aus der exponentiellen Wachstumsphase heraus eingefroren werden. Wie beim Anlegen von Subkulturen wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA gelöst, in frischem Medium aufgenommen und mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurde die Suspension für 2 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert und in einem errechneten Volumen Einfriermedium resuspendiert, sodass eine Zellkonzentration von  $1,5 \times 10^6$ /ml erreicht wurde. Aliquots von je 1 ml wurden in die vorgekühlten Kryoröhrchen gegeben. Im ersten Einfrierschritt wurden die Zellen 24 Stunden bei  $-80^\circ\text{C}$  in speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer gelagert. Danach erfolgte die Überführung in den Stickstofftank, wo sie in der flüssigen Phase ( $-196^\circ\text{C}$ ) zur Aufbewahrung verbleiben. Die Lagerung in diesem Medium ist nach Lindl (Lindl 2000) unbegrenzt möglich.

#### **2.3.5 Auftauen**

Die Kryoröhrchen wurden ohne Zwischenlagerung direkt vom Stickstofftank in ein Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  gegeben. Sobald kein Eiskern mehr sichtbar war, wurden die Zellen in ein Falconröhrchen mit 2 ml erwärmten, frischen Medium gegeben, gut durchmischt und 2 min bei 900 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Die gesamte Zellsuspension wurde auf 15 ml frisches Medium in eine 25cm<sup>2</sup> Kulturflasche gegeben und im Brutschrank 24 Stunden inkubiert. Dann erfolgte eine Wachstumskontrolle makroskopisch anhand der Indikatorfärbung des Mediums und mikroskopisch durch die optische Überprüfung des Wachstums. Erfolgte ein Farbumschlag von lachsfarben zu bernsteinfarben bevor sich eine 90%ige Konfluenz zeigte, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde etwa die Hälfte des verbrauchten Mediums vorsichtig aus der Kulturflasche abgesaugt und mit frischem Medium wieder aufgefüllt. Auf diese Weise verbleiben zelleigene Mediatoren die para- und autokrin wirken noch im Medium erhalten und unterstützen so das weitere Wachstum.

In der Regel kann das Standardprotokoll zur Subkultivierung sofort angewendet werden, sobald die Zellen einmal eine Zelldichte von 90% erreicht haben.

### **2.3.6 Mycoplasmentest**

#### Materialien

Myco Alert® Reagent

Myco Alert® Substrat

96-well Platte

#### Geräte

Luminometer

ORION

Mycoplasmen sind kleine, fakultativ intrazellulär parasitär lebende, zellwandlose Prokaryozyten mit einem Durchmesser von 0,2 – 0,8 µm. Anders als Kontaminationen mit extrazellulär lebenden Bakterien, Hefen oder Pilzen, die mikroskopisch anhand ihrer Eigenbewegung beziehungsweise Hyphenbildung erkannt werden können, ist bei Mycoplasmen der Nachweis erschwert und entsprechend aufwendiger. Zudem können Mycoplasmen die morphologischen sowie metabolischen Eigenschaften ihrer Wirtszellen verändern und damit zu falschen Ergebnissen in den Zellkulturexperimenten führen (McGarrity, Vanaman et al.1984; Mohr et al. 2000). Aus diesem Grund wurde vor Durchführung der eigentlichen zellkulturgebundenen Experimente mithilfe eines vorgefertigten Testkits von Myco Alert® ein Mycoplasmentest durchgeführt. Dazu wurde beim Anlegen einer neuen Subkultur das verbrauchte Medium, in dem zum eine ausreichende Menge abgestorbener Zellen enthalten sein sollte, aufgefangen und pro Zelllinie je 50µl in zwei Wells gefüllt. 5 Minuten nach Zugabe des vorgegebenen Reagenz wurden die Proben mittels Luminometer gemessen (Wert A), anschließend wurde das ebenfalls vorgefertigte Substrat auf die Proben gegeben. Nach einer definierten Reaktionszeit von 10 Minuten wurden die Proben erneut vermessen (Wert B). Die Division von Wert B durch Wert A darf dabei nicht > 1,2 sein, damit eine Infektion mit Mycoplasmen ausgeschlossen werden kann.

### **2.3.7 Wachstumsverhalten der individuellen Zelllinien – Ermitteln IC<sub>50</sub>**

#### Materialien

96-well-Platten

DMEM Nährmedium

WST Reagenz

Geräte

Phasenkontrastmikroskop

ELISA-Reader

Dynex MRX-TC Revelation

Um das optimale Wachstumsmilieu für die verschiedenen Zelltypen in 96-well-Platten zu erhalten, wurde zunächst eine Vorversuchsreihe gestartet mit dem Ziel die bestmögliche Kombination aus Zelldichte, Inkubationszeit und Nährstoffverbrauch zu ermitteln. Dies sind die wesentlichen Stellschrauben, die die Wachstumsgeschwindigkeit und das Wachstumsverhalten der Zellen festlegen. Eine zu geringe Zelldichte als auch eine zu hohe Zelldichte können das Wachstum auf unterschiedliche Weise hemmen. Zudem ist das Nährstoffangebot in einem Well auf eine geringe Menge von maximal 300µl Medium begrenzt, sodass auch hier eine frühzeitige Wachstumsstagnation aufgrund von Nährstoffmangel auftreten kann.

Zur Ermittlung der optimalen Zelldichte und Inkubationszeit wurden die Zellen in steigender Konzentration von 1 000 bis 40 000 Zellen/well in 96-well-Platten mit 100µl Medium ausgesät. Täglich wurde mithilfe des Phasenkontrastmikroskops die Konfluenz qualitativ überprüft sowie mittels WST-Proliferationsassay der Wachstumsfortschritt quantitativ kontrolliert. Rückschlüsse auf den Nährstoffverbrauch lieferte der Farbindikator des Mediums.

Die Beobachtung erfolgte über 4 Tage, wobei der Tag, an dem die Zellen ausgesät wurden als Tag 0 gewertet wurde mit entsprechender Beurteilung des Wachstums an Tag 1 (=24h-Wachstum), Tag 2 (=48h-Wachstum) und so fortlaufend. An Tag 1 wurden 100µl/well frisches Medium zugefügt um die in Vorversuch II geplante Behandlung mit Gemcitabin zu simulieren. Die Gemcitabinbehandlung geht nämlich mit einer Mediumzugabe einher, das heißt es müssen Verdünnungsvorgänge mit berücksichtigt werden.

Für die WST-Messung wurde 10µl/well WST-Reagenz in jedes well zugegeben. Die Randbereiche der Wellplatten wurden dabei immer ausgelassen um Ergebnisbeeinträchtigungen zu umgehen. Der WST-Wert wurde jeweils nach 1, 2, 3 und 4 Stunden erfasst und ausgewertet.

Der Versuch wurde zwei Mal wiederholt, jeweils mit 4 Platten pro Zelllinie um eine genügend große Datenmenge zu gewinnen und die optimale Zellzahl/well möglichst genau zu bestimmen.

### 2.3.8 Gemcitabinempfindlichkeit der individuellen Zelllinien (IC<sub>50</sub>)

Nach Ermittlung der optimalen Zellzahl/well wurde die Gemcitabinempfindlichkeit der einzelnen Zelllinien untersucht und die minimale Hemmkonzentration (MHC) bestimmt, sowie die Konzentration, bei der 50% der Zellen abgetötet wurden (IC<sub>50</sub>).

Die Zellen wurden orientiert an den Ergebnissen von Vorversuch I ausgesät wie folgt:

- MIA PaCa2: Zelldichte 3000 Zellen/well
- FG und L3.6: Zelldichte 5000 Zellen/well

Über Nacht (24h) erfolgte die Inkubation mit 100µl/well Zellsuspension bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>.

Die Gemcitabinbehandlung wurde jeweils an Tag 1, sprich 24 Stunden nach Aussähen der Zellen durchgeführt. In mehreren aufeinander aufbauenden Versuchsreihen wurde die Verdünnungsreihe immer enger gefasst um die MHC und IC<sub>50</sub> möglichst genau zu ermitteln. Im Einzelnen war der Ablauf wie folgt: die Gemcitabinkonzentration wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten in mol umgerechnet. Eine Gemcitabinkonzentration von 38 mg/ml wie sie standardmäßig von der Apotheke ausgegeben wird und in der Klinik Anwendung findet, entspricht einer molaren Konzentration von 126,81 mM.

Da in vorangegangenen Arbeiten schon eine verhältnismäßig hohe direkte Gemcitabinempfindlichkeit für MIA PaCa-2 Zellen veröffentlicht wurde, wurde ein Verdünnungsbereich um diesen vorgegebenen Wert gewählt.

Im ersten Versuchsdurchlauf erfolgte eine Behandlung mit 0,0 nM - 0,5 nM - 1,6 nM - 4,8 nM - 14,5 nM - 43,5 nM - 130,5 nM - 391,4 nM - 1174,2 nM - 3522,5 nM.

Danach wurde das Spektrum der Verdünnungsreihe verschmälert: 0,0 nM - 0,2nM - 0,5 nM - 1,0 nM - 2,0 nM - 4,0 nM - 5,0 nM - 10,0 nM - 20,0 nM - 40,0 nM.

Die WST-Messung erfolgte wieder durch Zugabe von 10µl/well WST-Reagenz und Erfassung des 2-Stunden-Wertes.





### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 TEIL I - HERSTELLUNG UND ANALYTIK VON GEMCITABIN-TSL

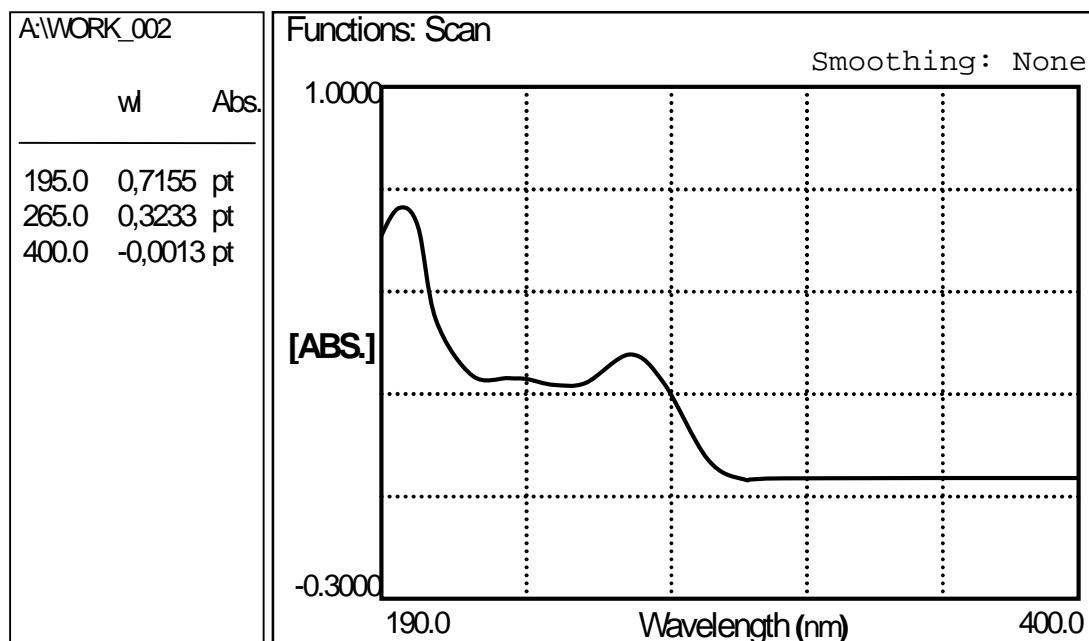
##### 3.1.1 Qualitativer und quantitativer Nachweis von 2'-Deoxyuridin und Gemcitabin UV/VIS Spektroskopie

Sowohl 2'-Deoxyuridin (dU) als auch Gemcitabin bilden farblose Lösungen und können nicht wie vergleichsweise Carboxyfluorescein im Fluoreszenzspektrometer nachgewiesen werden. Daher muss eine alternative Möglichkeit gefunden werden, diese beiden Stoffe sowohl qualitativ als auch quantitativ nachzuweisen. Eine Methode zum Nachweis von freiem dU beziehungsweise freiem Gemcitabin ist die UV/VIS-Spektrometrie, die auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz aufbaut, welches die Korrelation zwischen Absorption und Konzentration beschreibt:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

( $E_{\lambda}$  = Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $d$  = Schichtdicke des durchstrahlten Materials,  $\epsilon_{\lambda}$  = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient)

Die UV-Photospektrometrie ist eine einfache aber dennoch sensible Methode die Konzentration eines Stoffes anhand seiner Absorption bei einer bekannten Wellenlänge zu bestimmen. Diese Wellenlänge der maximalen Absorption muss zunächst festgestellt werden. Außerdem soll später die Konzentration des Wirkstoffs mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfasst werden; dazu ist es ebenfalls notwendig die Wellenlänge der maximalen Absorption zu kennen.



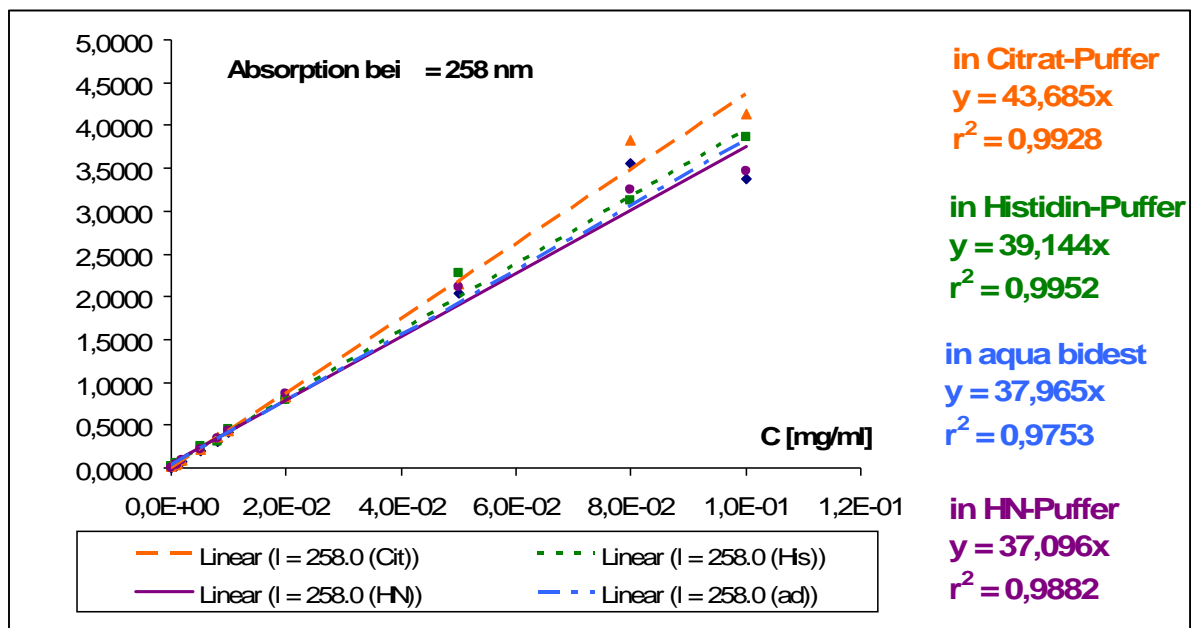
**Abb. 3.1** UV/VIS Spektrometrie von Gemcitabin in bidestilliertem Wasser

Die Absorptionsspektren von dU und Gemcitabin wurden in verschiedenen Lösungen untersucht um zum einen den Einfluss der jeweiligen Lösungen auf die Lage der Peaks und zum anderen auf das Absorptionsspektrum selbst zu überprüfen. Dabei kann auch ein etwaiger Einfluss des pH-Wertes beurteilt werden.

### 3.1.1.1 Ergebnisse für dU

Die Messkurve in bidestilliertem Wasser zeigt zwei Absorptionsmaxima: der erste Peak liegt bei  $\lambda=202$  nm und der zweite bei  $\lambda=258$  nm. Konzentrationen ab  $5 \times 10^{-4}$  mg/ml bis  $8 \times 10^{-2}$  mg/ml können sicher nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Der Korrelationskoeffizient  $r^2= 0,99$  belegt den proportionalen Zusammenhang zwischen Konzentrationsanstieg und Absorptionszunahme.

Die Absorption bei  $\lambda=202$  nm ist in anderen Verdünnungsmitteln als  $H_2O$  gestört, daher wird für die Analytik lediglich der Peak bei 258nm verwertet, der nicht durch die individuellen Absorptionen der Pufferlösungen beeinflusst wird.



**Abb. 3.2** Korrelation von Absorption und Konzentration von dU in unterschiedlichen Lösungen (gilt repräsentativ auch für Gemcitabin).

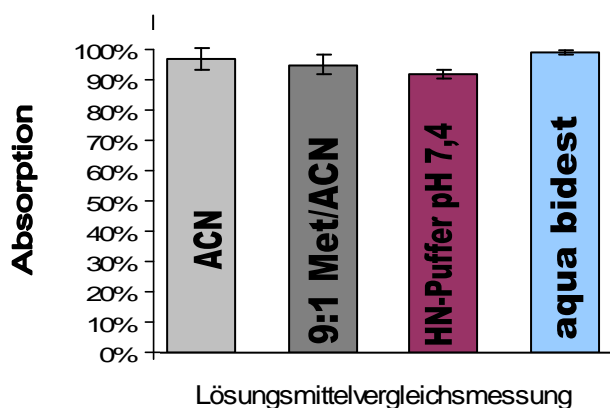
### 3.1.1.2 Ergebnisse für Gemcitabin

Hier werden ebenfalls zwei Banden in bidestilliertem Wasser beobachtet und ebenso die gleichen Störungen in anderen Lösungen beim ersten Peak gesehen (Abb. 3.1). Die Maxima finden sich für Gemcitabin leicht verschoben zu denen des dUs und liegen bei  $\lambda = 195 \text{ nm}$  sowie bei  $\lambda = 265 \text{ nm}$ . Aufgrund der geringen Störungsanfälligkeit des zweiten Peaks, wird das Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 265 \text{ nm}$  für analytische Zwecke genutzt.

Der Korrelationskoeffizient für die gemessene Absorption und Konzentration in bidestilliertem Wasser beträgt hier  $r^2 = 0,98$  bei  $\lambda = 265 \text{ nm}$  (Abb. 3.2) und somit ist die Methode der UV/VIS Spektrometrie für den Nachweis von freiem Gemcitabin geeignet.

Zusätzlich wurden Gemcitabinproben mit bekannter Konzentration in HN-Puffer pH = 7,4, Acetonitril sowie Methanol/Acetonitrillösung 9:1 vergleichend gemessen (Abb. 3.3). Als Richtwert für die „wahre“ Gemcitabinkonzentration galt hierbei der Absorptionswert in bidestilliertem Wasser. Da im Rahmen der Probenaufbereitung für die Feststellung des eingeschlossenen Wirkstoffs ebenso wie im Protokoll für die Temperaturkurven der Gemcitabinliposomen diese Lösungsmittel als Trägerlösung in der UV/VIS Spektrometrie zum Einsatz kommen, soll ein lösungsmittelbedingter Fehler ausgeschlossen werden.

Die Auswertung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messergebnissen in den unterschiedlichen Lösungsmitteln, sodass kein Fehler zu erwarten sein sollte.



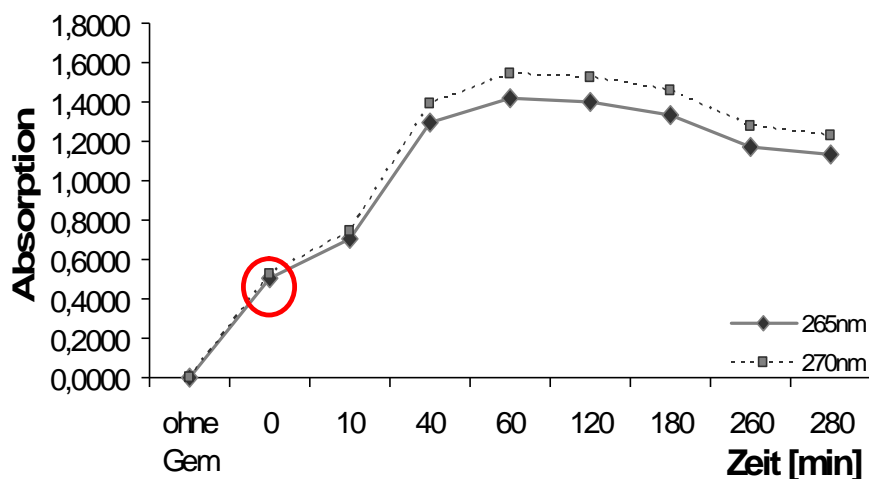
**Abb. 3.3**

Vergleichsmessung von Gemcitabin in verschiedenen Lösungsmitteln.

(n = 3)

100% Absorption wird in aqua bideest angenommen.

Bei der Messung der Temperaturkurven hingegen sind zum Teil unschlüssige Absorptionswerte aufgefallen, die zu einer Verzerrung der Temperaturkurven führte. Als Teil der Fehlersuche wurde eine Gemcitabin/Acetonitrillösung mit bekannter Konzentration angesetzt und nach festgelegten Zeitintervallen UV/VIS spektrometrisch vermessen (Abb. 3.4). Dabei fiel auf, dass lediglich der Wert der ‚frisch‘ angesetzten Lösung der tatsächlichen Gemcitabinkonzentration entspricht, während nach längerem Stehen-lassen der Proben die Messwerte falsch hoch ermittelt werden. Die Konsequenz sind fehlerhafte Messergebnisse und alle Proben, die eine Messung in Acetonitril notwendig machen, werden fortan immer erst kurz vor der Messung resuspendiert.



**Abb. 3.4**

Einfluss von Acetonitril auf die Absorptionswerte, wenn die Proben nicht unmittelbar vermessen werden.

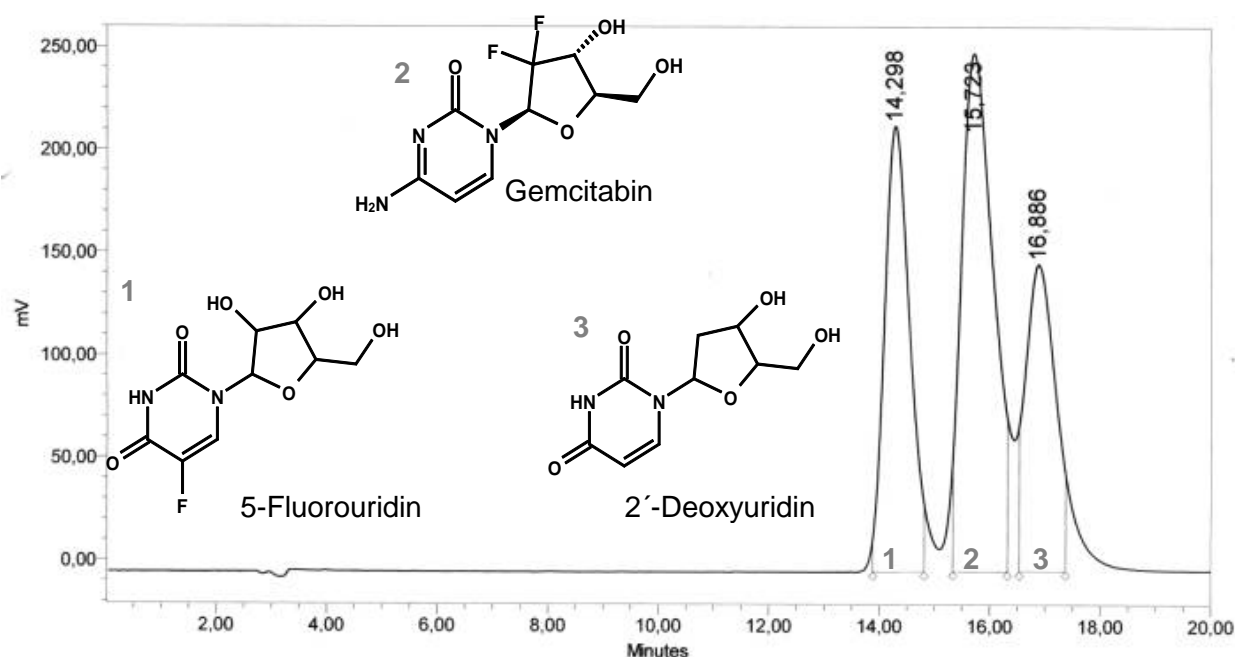
○ = tatsächlicher zur Gemcitabinkonzentration korrelierender Absorptionswert.

Die Genauigkeit der oben beschriebenen UV/VIS Spektrometrie gestützten Methode wurde ferner mittels HPLC überprüft. Die Auswertung der Peaks hat gezeigt, dass sich die Konzentrationen der Testlösungen im Mittel um 6% unterscheiden (Tab 3.1).

Probe	Methode:	UV ( $\mu\text{g/mL}$ )	HPLC ( $\mu\text{g/mL}$ )
A		0,07	0,07
B		0,10	0,11
C		0,07	0,07
D		0,13	0,15

**Tab. 3.1** Vergleich der Messergebnisse der UV/VIS-Spektrometrie und HPLC

Zusätzlich wurden 5-Fluorouridin und dU im HPLC-Lauf getestet um die Verwertbarkeit dieser beiden dem Gemcitabin strukturverwandten Stoffe als interne Standards zu untersuchen. Als geeignet erscheint hier 5-Fluorouridin, da die Peaks von dU und Gemcitabin nicht getrennt werden konnten (Abb. 3.5).



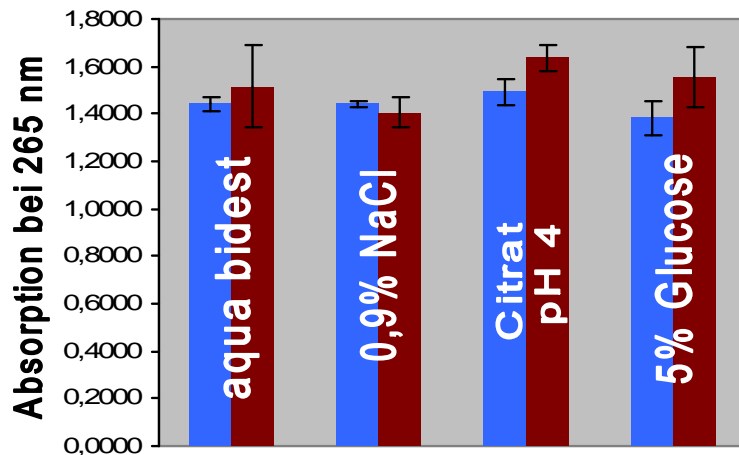
**Abb. 3.5** Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC): Elutionsdiagramm von 5-Fluorouridin, Gemcitabin und 2'-Deoxyuridin.

### 3.1.2 Stabilität von dU und Gemcitabin bei Hyperthermie

Der Wirkstoff ist bei der Liposomenherstellung Temperaturen um die 60°C ausgesetzt und muss diese auch unbeschadet überstehen. Zur Untersuchung der Stabilität werden Proben von der Stammlösung mit Wasser und den gängigen Puffern verdünnt und bei 60°C für 60 Minuten inkubiert. Vor und nach der Inkubation werden die Proben mittels UV/VIS Spektrometrie untersucht und die Absorptionswerte anschließend verglichen (Abb. 3.6).

Es wird beobachtet, dass mit Ausnahme der 0,9% NaCl Probe, in allen Proben eine Zunahme von im Mittel 9% der Absorption stattfindet. Die Wiederholung des Versuchs zeigte die

gleichen Ergebnisse. Hierfür wird ein Aufkonzentrierungseffekt durch verdampfen als Erklärung angesetzt. Die optische Analyse der Spektrometriedaten zeigt keine Verschiebung oder Veränderung der Peaks nach der Inkubation, sodass kein thermischer Schaden an den dU- und Gemcitabinmolekülen angenommen wird.



**Abb. 3.6** Stabilität von Gemitabin nach einstündiger Erwärmung bei 60°C

(n = 3 für 0,9% NaCl und Citrat pH 4; n = 6 für 5% Glucose und H<sub>2</sub>O)

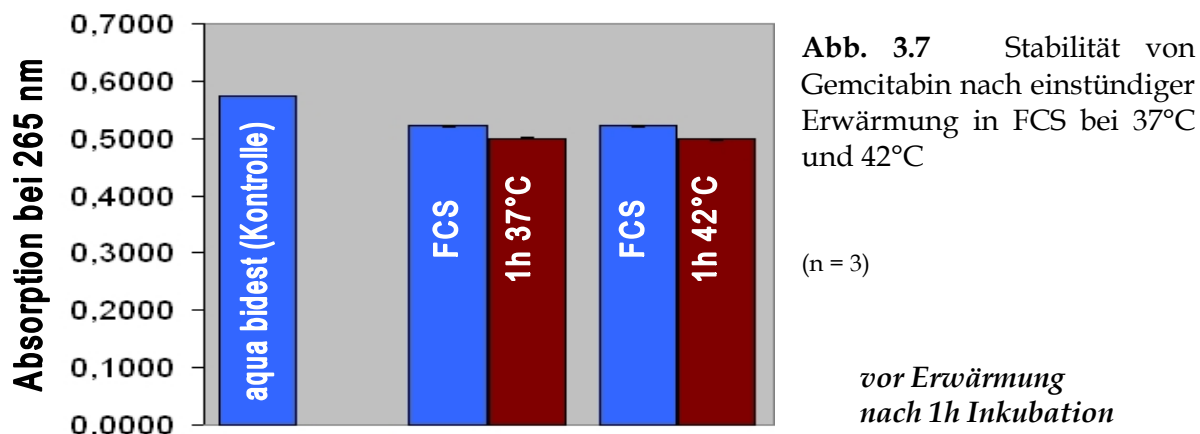
■ vor Erwärmung  
■ nach 1h bei 60°C

### 3.1.3 Stabilität von Gemcitabin in Fetalem Kälberserum (FCS)

Fetales Kälberserum soll die Bedingungen im lebenden Organismus simulieren und entsprechend sollen die Wechselwirkungen des Wirkstoffs mit diesem natürlichen ‚Lösungsmittel‘ sowie die Veränderungen der UV-Absorption begutachtet werden.

Die Proben werden bei 37°C als Korrelat zur Körpertemperatur und bei 42°C zur Nachstellung der Hyperthermiebedingungen für eine Stunde inkubiert. Die anschließende Auswertung der Messungen zeigt, dass in FCS ebenfalls nach der Inkubation kein signifikanter Unterschied zwischen den nachgewiesenen Konzentrationen besteht (Abb. 3.7). Allerdings sind die in FCS ermittelten Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollmessung in bidestilliertem Wasser um etwa 9% niedriger.

Also Ursache kann die aufwendigere Aufbereitung der FCS-haltigen Proben gesehen werden. FCS stört die UV/VIS Spektrometrie und muss durch Proteinfällung aus den Proben extrahiert werden. Dazu wurde Acetonitril verwendet und die Proben zentrifugiert um die denaturierten Proteinfragmente zu entfernen. Dabei wird angenommen, dass Spuren des Gemcitabins mit der Proteinfällung mitgefällt werden. Aus diesem Grund wird dem beschriebenen Unterschied zwischen den Proben und der Kontrolle keine für die weiteren Versuche relevante Bedeutung beigemessen.

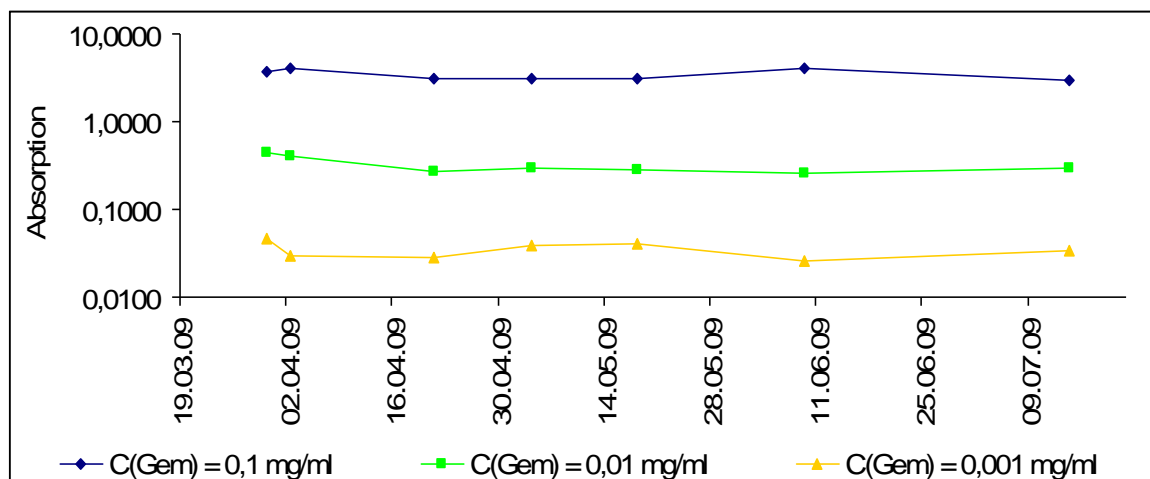


### 3.1.4 pH-Metrie

Der pH-Wert einer dU-Lösung mit einer Konzentration von  $c = 2,5 \text{ mg/ml}$  liegt bei 3,8. Dieser saure pH hat zur Konsequenz, dass die Liposomen mit eingeschlossenem dU bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden müssen um die Hydrolyse der Lipide zu Lysolipiden zu verhindern. Der Herstellerangabe zufolge liegt der pH-Wert von Gemcitabin bei 3,58; folglich gilt hier derselbe Lagerungshinweis wie für die dU-Liposomen.

### 3.1.5 Gemcitabin – Haltbarkeit

In wechselnden Abständen wurden Proben von einer Charge Gemcitabinlösung entnommen, die bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert wurde. Die Verdünnungsreihen wurden immer nach gleichem Schema durchgeführt, die Absorption bei  $\lambda = 265 \text{ nm}$  gemessen und gegen den jeweiligen vorangegangenen Wert aufgetragen (Abb. 3.8). Anhand der Absorptionswerte konnten über einen Zeitraum von 5 Monaten keine nennenswerte Veränderung festgestellt werden. Trotzdem kann eine Veränderung der Struktur des Wirkstoffs mit den hier zur Anwendung gekommenen Methoden nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.8** Photospektrometrische Überprüfung der Gemcitabinkonzentration bei Lagerung bei +4°C. Absorptionsmaxima wurden bei  $\lambda = 265$  nm aufgezeichnet.

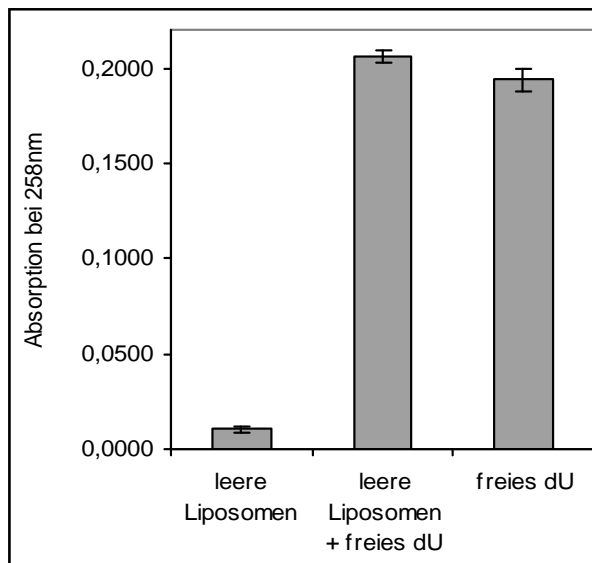
### 3.1.6 Quantitativer Nachweis des eingeschlossenen Wirkstoffs (dU/Gemcitabin)

Zunächst wurde untersucht, ob der dU-Gehalt in den intakten Liposomen durch UV/VIS-Spektrometrie bestimmt werden kann. Eine Analyse des Absorptionsspektrums von intakten mit dU beladenen Liposomen zeigte jedoch eine von Störzacken überlagerte UV-Absorptionskurve im zur Bestimmung des dU und Gemcitabins fraglichen Bereich und war somit ungeeignet.

Die Aufbereitung der Proben erfolgte fortan mit Acetonitril, das auch bereits zur Proteinfällung genutzt wird. Auf diese Weise werden die liposomalen Strukturen aufgelöst und der eingeschlossene Wirkstoff vollständig freigesetzt.

Die Absorption bei 258nm wurde durch die Liposomenreste vernachlässigbar gering beeinflusst (Abb. 3.9), sodass die Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung des eingeschlossenen Wirkstoffs getestet werden kann. Der Absorptionswert bei 202nm unterlag indes einem größeren Einfluss durch Lipidreste beziehungsweise Störungen durch die Trägersubstanz, sodass dieser sich nicht zur Bestimmung eignet.





**Abb. 3.9**

*Einfluss von Lipidresten auf die Messung des eingeschlossenen Wirkstoffs*

*„leere Liposomen“ = Lipidreste von unbeladenen Liposomen*

*Trägersubstanz für die Messung: Bdestilliertes Wasser*

(n = 3)

Nach der Zugabe von Acetonitril zu den Liposomenlösungen bildete sich eine weißliche Ausflockung, die sich nach der Zentrifugation abgesetzt hat. Da das Pellet sich nicht resuspendieren lies, wurde auf eine weitere Extraktion des Pellets durch erneute Zugabe von Acetonitril verzichtet. Die Methode wurde weiter optimiert um die Eindampfzeit und das Probenvolumen zu verringern (vgl. Kap. 2.2.13 im Material- und Methodenteil).

Die Lösungen der Eichgerade, die nur Wirkstoff enthielten, blieben unverändert klar. Nach dem Eindampfen hatte sich nur bei der höchsten Konzentration der Eichgerade ein weißlicher Schleier gebildet; Diese sind entweder homogene weißliche Schleier oder weißliche Flocken. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Rückstände durch Gemcitabin bzw. dU, welche als Feststoffe weißliche Pulver sind. Diejenigen Reagenzgläser, die die Liposomenverdünnungen enthalten hatten, wiesen hingegen immer weißliche Rückstände auf, am wahrscheinlichsten Lipidrückstände und möglicherweise auch Ionen der Puffer, welche ebenfalls in ihrer Ursprungsform weißliche Pulver sind. Da diese Unterschiede auch innerhalb der gleichen Proben bei Doppelbestimmung auftreten und die Messergebnisse sich nicht signifikant unterscheiden, wird diesem Phänomen keine Bedeuten beigespflichtet.

### 3.1.7 Qualitätskriterien

#### 3.1.7.1 Größe, Zetapotenzial und Polydispersionsindex (PDI)

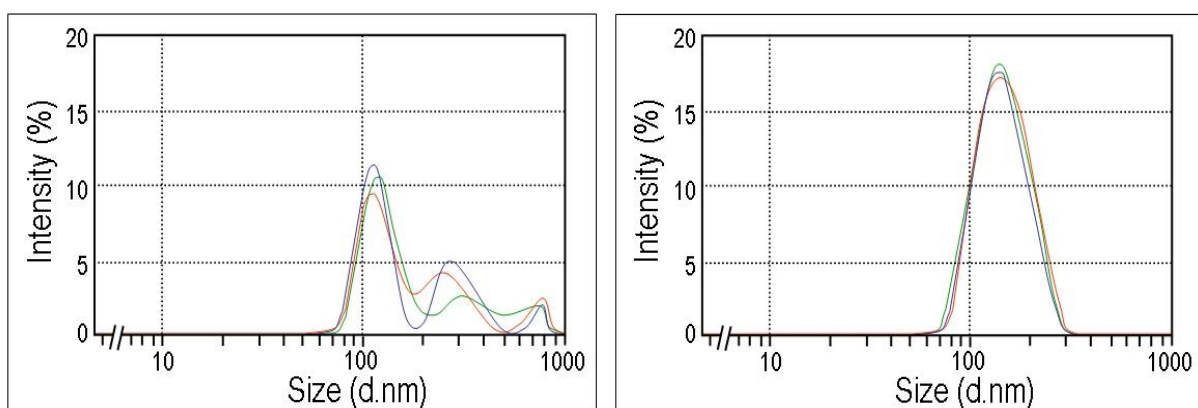
Von jeder Charge wurde jeweils vor und nach der Inkubation eine Charakterisierung durchgeführt mit dem Ziel einer Qualitätsüberprüfung der entstandenen Liposomen. Der PDI wurde als Marker für die Homogenität der Liposomenlösungen betrachtet.

Für die Gemcitabinversuchsreihen wurden dabei drei verschiedene native Ausgangsliposomenlösungen verwendet: Glucose-5%-haltige Liposomen, HN-Puffer-Liposomen (pH 7,4) oder Citratliposomen (pH 4) als Repräsentanten eines ungepufferten Systems, eines gepufferten Systems bei neutralem pH und eines gepufferten Systems bei saurem pH.

Schon makroskopisch fielen nach der Inkubation Unterschiede zwischen den einzelnen Liposomenlösungen auf. Genauer wird darauf vor allem in Kapitel 3.1.9.2 eingegangen.

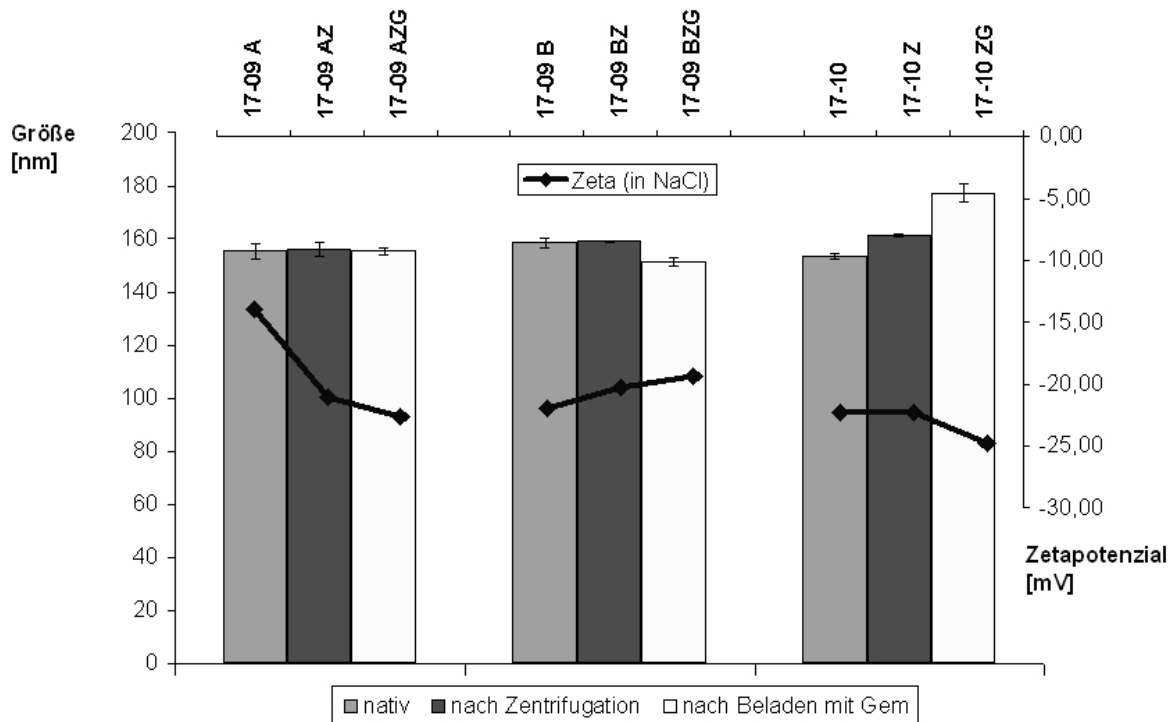
Bei der Auswertung zeigten sich vor allem bei den Glucose-haltigen Liposomen große Differenzen zwischen den nativen und den beladenen Liposomen, was mit den Versuchsbeobachtungen korreliert. Die qualitativ besten Ergebnisse konnten bei den HN-Puffer-haltigen Liposomen erlangt werden.

Die Grafik Abb. 3.10 verdeutlicht den Unterschied zwischen qualitativ minderwertigen Liposomen, die als Ausdruck der Inhomogenität der Lösung eine mehrgipflige Größenverteilungskurve aufweisen, wohingegen die rechte Kurve das Bild einer sehr homogenen Liposomenlösung zeigt, die sowohl die Qualitätskriterien der Größenverteilung als auch des schmalen PDI erfüllt. Ein PDI kleiner 0,6 (Hirsch et al. 2008; Massing et al. 2000) gilt als sicherer Qualitätsmarker für die Homogenität der Lösung. Keine der verwendeten Chargen hatte einen PDI  $>0,6$ , allerdings sind durchaus Unterschiede zwischen den Liposomenformulierungen aufgefallen. So zeigte sich bei den HN-Puffer- und Citratpufferhaltigen Liposomen im Vergleich zu den Glucose-5%-haltigen Liposomen sowohl vor als auch nach der Inkubation durchweg ein kleiner PDI um 0,1 im Gegensatz zu Werten um 0,4. Daher wurde in der Folge ein PDI  $<0,2$  als Qualitätskriterium angesehen.



**Abb. 3.10** Größenverteilung von Glucose-haltigen Gemcitabinliposomen (links) als Beispiel für eine mindere Qualität und HN-Puffer-haltigen Gemcitabinliposomen (rechts) als Beispiel einer hochwertigen Liposomenlösung.

Abb. 3.11 verdeutlicht den Einfluss des Beladungsvorganges auf hochwertige Liposomenlösungen: Die Größenverteilung bleibt nahezu unverändert insbesondere bei den HN-Puffer-haltigen Liposomen.



**Abb. 3.11** Vergleich von Größe und Zetapotenzial nach Herstellung der Liposomen (nativ), nach Aufkonzentrierung (Zentrifugation) und nach Beladen mit Gemcitabin;

**Charge [17/09]A:** HN-Puffer-Liposomen

(nach dem Beladen gegen HN-Puffer gesäult)

**Charge [17/09]B:** Citrat-Puffer Liposomen

(nach dem Beladen gegen Citrat-Puffer pH 4 gesäult)

**Charge [17/10]:** Citrat-Puffer Liposomen

(nach dem Beladen gegen HN-Puffer pH 7,4 gesäult)

(n = 3)

### 3.1.7.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

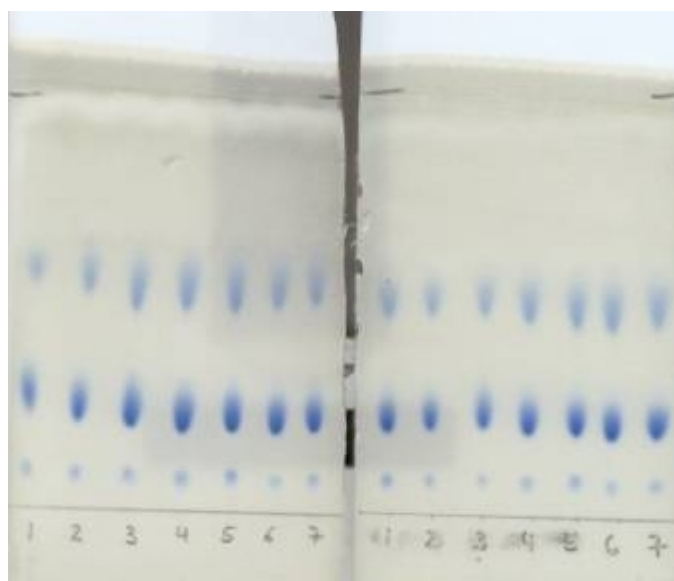
Die DC ist ein sensibles Trennverfahren um die tatsächliche Zusammensetzung der Liposomen zu überprüfen. DSPC und DPPC bilden dabei eine gemeinsame Bande beim verwendeten Laufmittel, was allerdings vernachlässigbar ist. Wichtig ist der Anteil des DPPG<sub>2</sub> als entscheidende Strukturkomponente und der Anteil der Lysolipide. Lysolipide entstehen bei der Herstellung und Weiterverarbeitung der Liposomen. Dieser Anteil sollte möglichst gering gehalten werden, da er erheblichen Einfluss auf die Membranpermeabilität hat (Mills 2005).

Die Abb. 3.12 zeigt eine DC-Platte mit Proben einer Liposomencharge, die über verschiedene Zeiträume und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurde.

<b>SOLL-Formulierung:</b>		DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)			
<b>IST-Formulierung:</b>			DPPC/DSPC [%]	DPPG <sub>2</sub> [%]	Lysolipide [%]
HIN-Puffer TSL	"native"	MW (n=3)	75,7	25,1	0,0
Citrat TSL	Liposomen	MW (n=3)	74,2	25,9	0,0
Gemcitabin-TSL	nach Inkubation	MW (n=24)	72,8	24,5	2,6

**Tab. 3.2** Dünnschichtchromatographie der thermosensitiven Liposomen vor und nach Beladen mit Gemcitabin. DSPC und DPPC lassen sich mit dieser Methode nicht trennen und werden somit gemeinsam abgebildet und berechnet.

Bei allen untersuchten Proben war festzustellen, dass die SOLL-Formulierung von DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m) mit der IST-Zusammensetzung weitgehend übereinstimmen (Tab. 3.2). Es zeigt sich ein Auftreten von 2,6% Lysolipiden nach der Inkubation, d. h. nach Beladen mit Gemcitabin, allerdings haben Lysolipide erst ab einem Anteil von 5 – 10% Einfluss auf die strukturelle Integrität der TSL (Grit u. Crommeli, 1993).



**Abb. 3.12**

DC (Dünnschichtchromatographie)-Platten mit Proben der Charge [15/26] (→ Glucose-haltige Liposomen) nach Inkubation mit Gemcitabin.

← DPPG<sub>2</sub>

← DSPC & DPPC

← Lysolipide

Formulierung (SOLL):  
DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)

### **3.1.8 Direkter Einschluss**

#### **3.1.8.1 dU-Liposomen**

Zunächst wurde erprobt, ob ein direkter Einschluss von Gemcitabin möglich ist. Dafür wurde das strukturverwandte dU verwendet um den Extruder und den Rotationsverdampfer nicht unnötig mit einer zytotoxischen Substanz zu verunreinigen. Die dU-Lösung (50mg/ml) wurde direkt auf einen Lipidfilm gegeben. Es zeigte sich, dass der Lipidfilm bei dieser Methode nur schwer löslich war und die Lösung ungewöhnlich viskös und nicht sehr trüb war, was zunächst auch noch nach der ersten Extrusion der Fall war. Nach 17 Extrusionen erschien die Lösung deutlich trüber, allerdings sehr zähflüssig bis gelartig und stark mit Luftblasen durchsetzt. Durch 10-sekündiges Zentrifugieren mit 5000 x G konnte ein Absetzen der Luftblasen nach oben erreicht werden.

Die Lösung war nun eher transparent und gelartig und Vorhandensein von Liposomen war fraglich. Andere höhermolekulare Strukturen erscheinen hier wahrscheinlicher.

Nach 30 Minuten Abkühlen bei +4°C wurde die Lösung wieder flüssiger und es konnte eine Säulenchromatographie durchgeführt werden um freies dU abzutrennen.

Die Liposomenlösungen liefen sehr langsam über die Säule. Im Anschluss wurden die akquirierten Lösungen eingefroren. Auf eine Analytik wurde verzichtet, da die so gewonnene Dispersion höchstwahrscheinlich nicht die gesuchten Bedingungen erfüllte. Es wurde fortan der indirekte Einfluss forciert untersucht.

### **3.1.9 Indirekter temperaturabhängiger Einschluss**

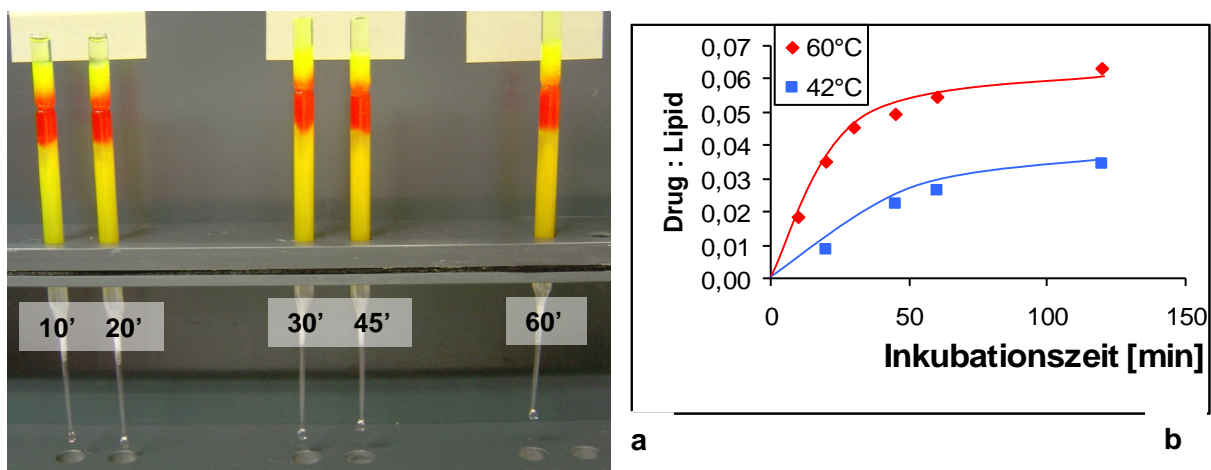
#### **3.1.9.1 Vorversuch mit CF-Liposomen**

In einem Vorversuch wurden NaCl-Liposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein durch indirekten Einschluss beladen. Hierzu wurde sich die Veränderung der Membranpermeabilität der Liposomen bei unterschiedlichen Temperaturen zu Nutze gemacht. Ziel war es, eine Alternative zu den bis dato in dieser Arbeitsgruppe angewandten Methoden des Wirkstoffeinschlusses zu erproben und anschließend für die Arbeit mit Gemcitabin zu nutzen. Dazu wurden gleiche Volumina 100mM CF-Lösung und Liposomendispersion bei 42°C und bei 60°C über verschiedene Zeitintervalle von 10 Minuten bis 2 Stunden inkubiert.

Der Farbstoff ermöglicht die einfache und schnelle Quantifizierung der eingeschlossenen Menge mittels Fluoreszenzspektroskopie.

Je länger inkubiert wurde desto dunkler waren die Liposomendispersionen, wobei die Lösungen bei 60°C allgemein dunkler gelb erschienen. Zur Bestimmung des CF:Lipid Verhältnisses wurde zunächst durch Säulenchromatographie nicht eingeschlossener Wirkstoff entfernt, eine Phosphatbestimmung durchgeführt und anschließend nach Zerstörung der Liposomen der Gehalt des eingeschlossenen Wirkstoffs mittels Fluoreszenzspektrometrie bestimmt und verglichen. Es zeigte sich, dass nach 2 Stunden Inkubation bei 60°C das CF:Lipidverhältnis am größten war (Abb. 3.13).

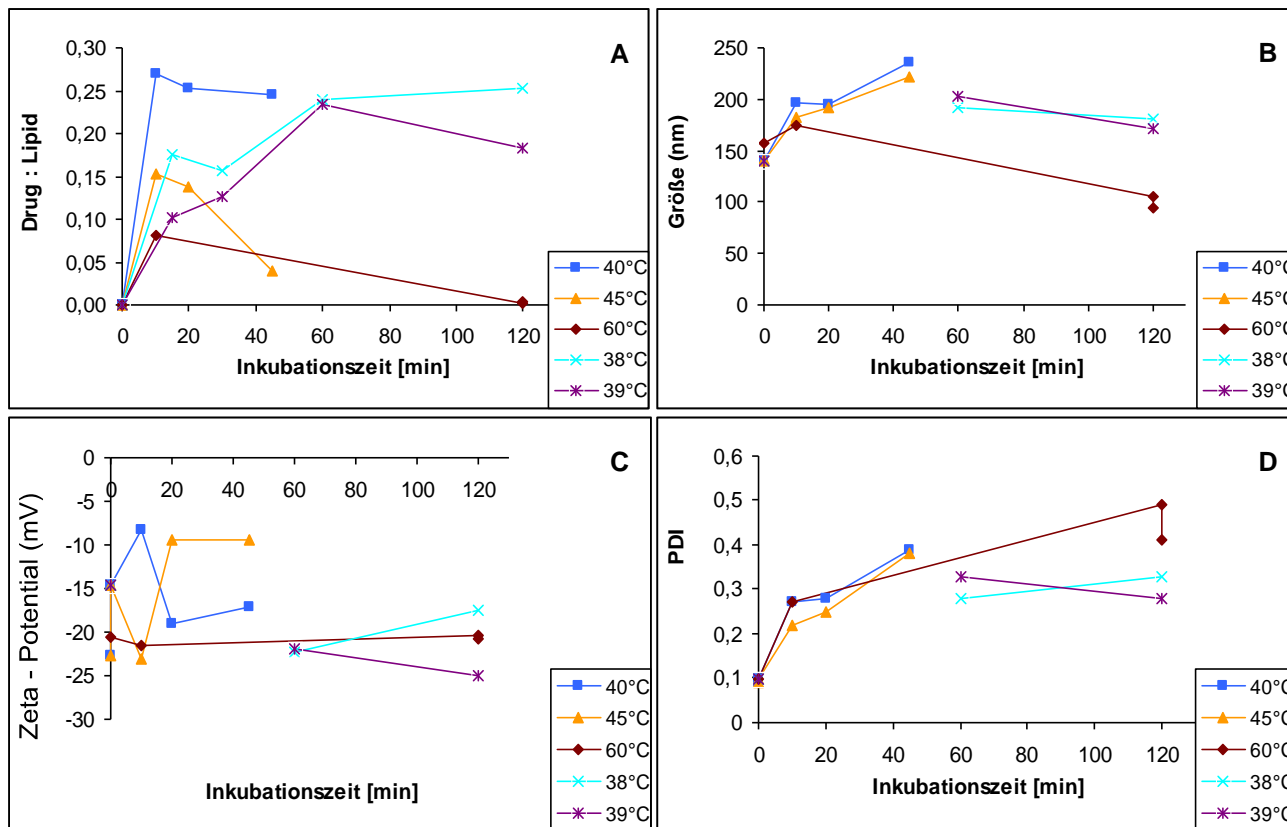
Vorteil dieser indirekten Methode ist zudem, dass weder Extruder noch Rotationsverdampfer kontaminiert werden. Dies ist auch in Hinblick auf die Arbeit mit Zytostatika von Bedeutung.



**Abb. 3.13** a) Säulenchromatographie der CF-Liposomen nach dem Beladen  
b) Auswertung des CF:Lipidverhältnisses der CF-Liposomen in Relation zur Inkubationszeit und -temperatur.

### 3.1.9.2 Gemcitabineinschluss in Glucose-5%-haltige Liposomen

Die ersten Versuche zum indirekten Gemcitabineinschluss wurden mit nativen Glucose-5%-haltigen Liposomen durchgeführt. 5%-Glucoselösung ist eine gängige Trägersubstanz für unterschiedliche Wirkstoffe. In erster Instanz wurde versucht, die optimalen Einschlussbedingungen zu ermitteln. Dazu wurden die nativen Liposomen bei Temperaturen von 38°C, 39°C, 40°C, 45°C oder 60°C für Zeitintervalle von 10 bis 120 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Drug:Lipid-Verhältnis bestimmt und die Qualitätskriterien Größe, Zetapotenzial und PDI begutachtet um den Erfolg der einzelnen Versuche quantitativ und qualitativ bewerten zu können.



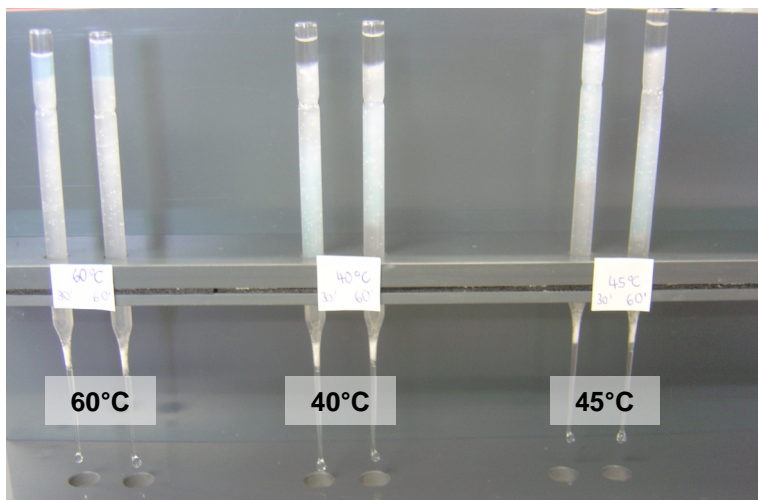
**Abb. 3.14** Graphische Auswertung der Gemcitabineinschlussversuche mit Glucose-5%-haltigen nativen Liposomen.

Aus Abb. 3.14 A lässt sich ableiten, dass bei einer Inkubationstemperatur von 40°C über 10 Minuten die größte Menge an Wirkstoff eingeschlossen wird, während bei niedrigeren Temperaturen die Inkubation wesentlich länger durchgeführt werden müsste. Bei Temperaturen ab 45°C waren die Liposomenlösungen nach der Inkubation offenbar so stark verändert waren, dass keine weitere Analytik mehr möglich war, weil keine weitere Probenaufbereitung mehr durchgeführt werden konnte. Fehlende Werte in den Grafiken beruhen auf nicht verwertbaren Messergebnissen oder der Verlust von Proben aufgrund von Veränderungen der Liposomenlösungen hinsichtlich Viskosität. Die Größe schwankt bei dieser Formulierung auffallend nach der Inkubation, ebenso wie das Zetapotenzial (Abb. 3.14 B + C). Der PDI >0,2 verdeutlicht die Inhomogenität der enthaltenen Liposomen. Die Versuchsdurchführung wurde wiederholt und erzielte vergleichbare Ergebnisse, sodass nicht von einem methodischen Fehler ausgegangen wurde.

Makroskopisch erschienen die Lösungen nach der Inkubation sehr unterschiedlich, je nach Inkubationsdauer und -temperatur. Die Trübung der Lösungen nahm mit der steigender Temperatur und Erwärmungszeit ab; die Lösungen wurden zudem visköser bis gelartig. Bei



der Säulenchromatographie zogen die geleeartigen Proben (App. 3.15) nicht in die Säule ein, sodass kein Eluat gewonnen werden konnte und die Proben nur bedingt zur weiteren Analyse verwendet werden konnten. Ein Drug:Lipid-Verhältnis konnte daher bei diesen Proben nicht ermittelt werden und wurde mit den Wert ,0' in die grafische Auswertung eingepflegt. Aus den ungesäulten Lösungen wurden Proben entnommen und der Qualitätsüberprüfung zugeführt um einen Eindruck von den molekularen Veränderungen der Proben durch die Inkubation zu erlangen. Die Resultate der Analytik sind in Kapitel 3.1.7 unter „Qualitätskriterien“ beschrieben. Darauf aufbauend wurden die Einschlussbedingungen weiter angepasst.



**Abb. 3.15**  
Säulenchromatographie von Glucose-5%-haltigen Liposomenlösungen nach der Inkubation. Nach Inkubation bei 60°C bleiben die Liposomen oben auf der Säule hängen. Diese Proben waren für die Analytik nicht mehr geeignet.

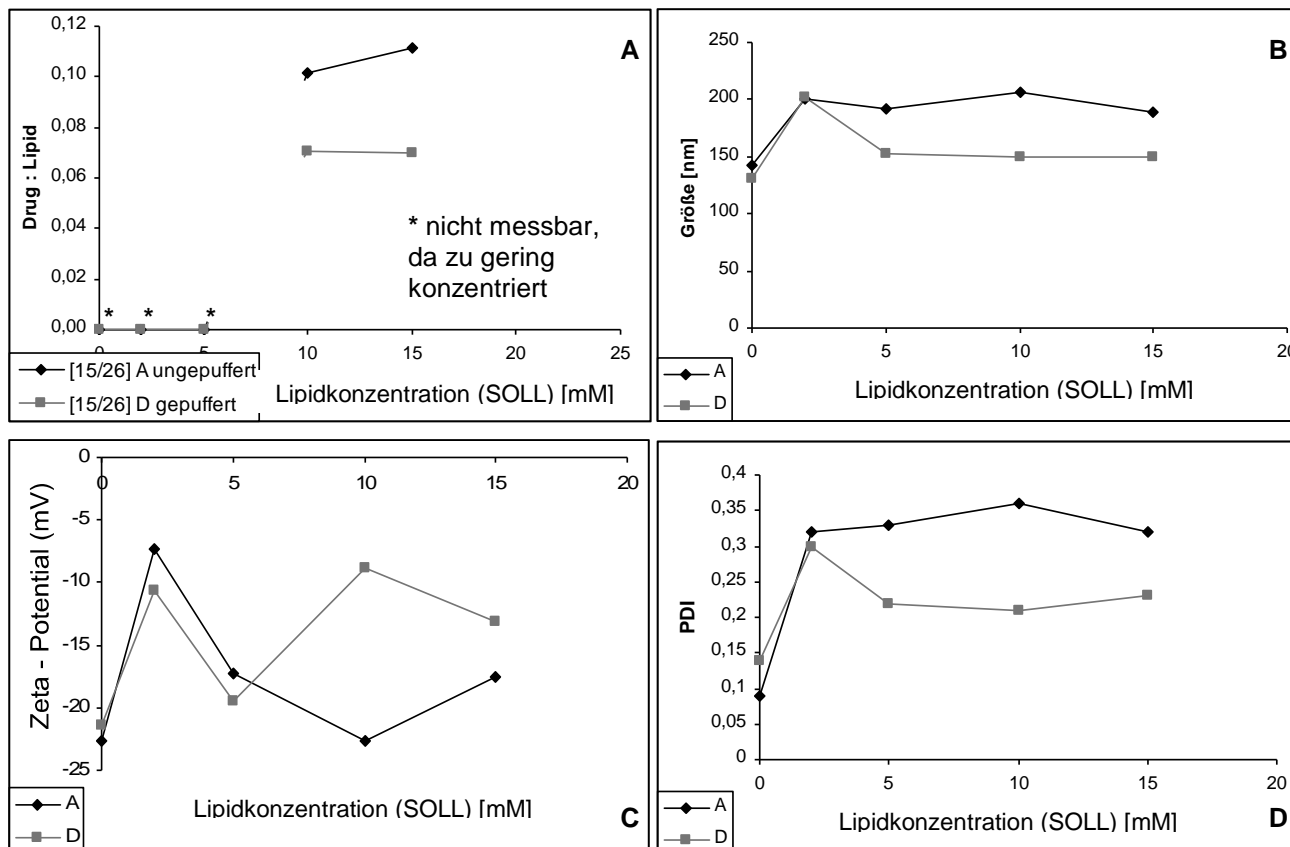
### 3.1.9.3 Einschluss mit verschiedenen Lipidkonzentrationen

Als weitere Einflussgröße für die Optimierung des Drug:Lipid-Verhältnisses wurde die Konzentration der nativen Liposomengrößen untersucht. Zudem wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls der pH-Einfluss begutachtet, indem Liposomen mit ungepufferter 5%-Glucoselösung und solche mit gepufferter 5%-Glucoselösung hergestellt wurden.

Für den Einschluss wurden die Proben 10 Minuten bei 40°C inkubiert, gesäult und anschließend der Analytik zugeführt.

In Hinblick auf eine großtechnische Anwendung, bringt die Aufkonzentrierung als ökonomischen Seiteneffekt ein Einsparen von Wirkstoff mit sich, da die Lösungen vor der Inkubation 1:1 (v/v) zusammengegeben wurden und ein erheblicher Anteil des zugeführten Wirkstoffs durch die Säulenchromatographie wieder herausfiltriert werden konnte.





**Abb. 3.16** Einfluss der Lipidkonzentration auf den Gemcitabineinschluss  
 Verwendete Chargen: [15/26] A (Liposomen mit ungepufferte 5%-Glucose-Lösung)  
 [15/26] D (Liposomen mit gepufferte 5%-Glucose-Lösung)

Beim Drug:Lipid-Verhältnis (Abb. 3.16 A) fällt zunächst auf, dass der Einschluss bei Verwendung von Liposomen, die ungepufferte 5%-Glucoselösung enthalten dem der Charge mit gepufferte 5%-Glucose-haltigen Liposomen überlegen ist. Im Vergleich zum Vorversuch (vergl. Abb. 3.14) ist allerdings zudem noch auffällig, dass das Drug:Lipid-Verhältnis wesentlich geringer war. Festgehalten werden kann das folgende: eine Lipidkonzentration von mindestens 10 mM war nötig um einen suffizienten Gemcitabineinschluss gewährleisten zu können. Höher konzentrierte Lösungen zeigten keinen Nachteil gegenüber der niedrigst-sinnvollen Konzentration, weisen aber den Vorteil auf, dass Wirkstoff gespart werden kann. Aufgrund der hohen Varianz der Eigenschaften bei der Überprüfung der Qualitätskriterien und der unzuverlässigen Einschlusseffizienz, wird von weiteren Experimenten mit 5%-Glucose-haltigen Liposomen zum Gemcitabineinschluss abgesehen und nach besseren Einschlussbedingungen gesucht. In die engere Auswahl kamen HN-Puffer-haltige Liposomen und Citrat-Puffer-haltige Liposomen.

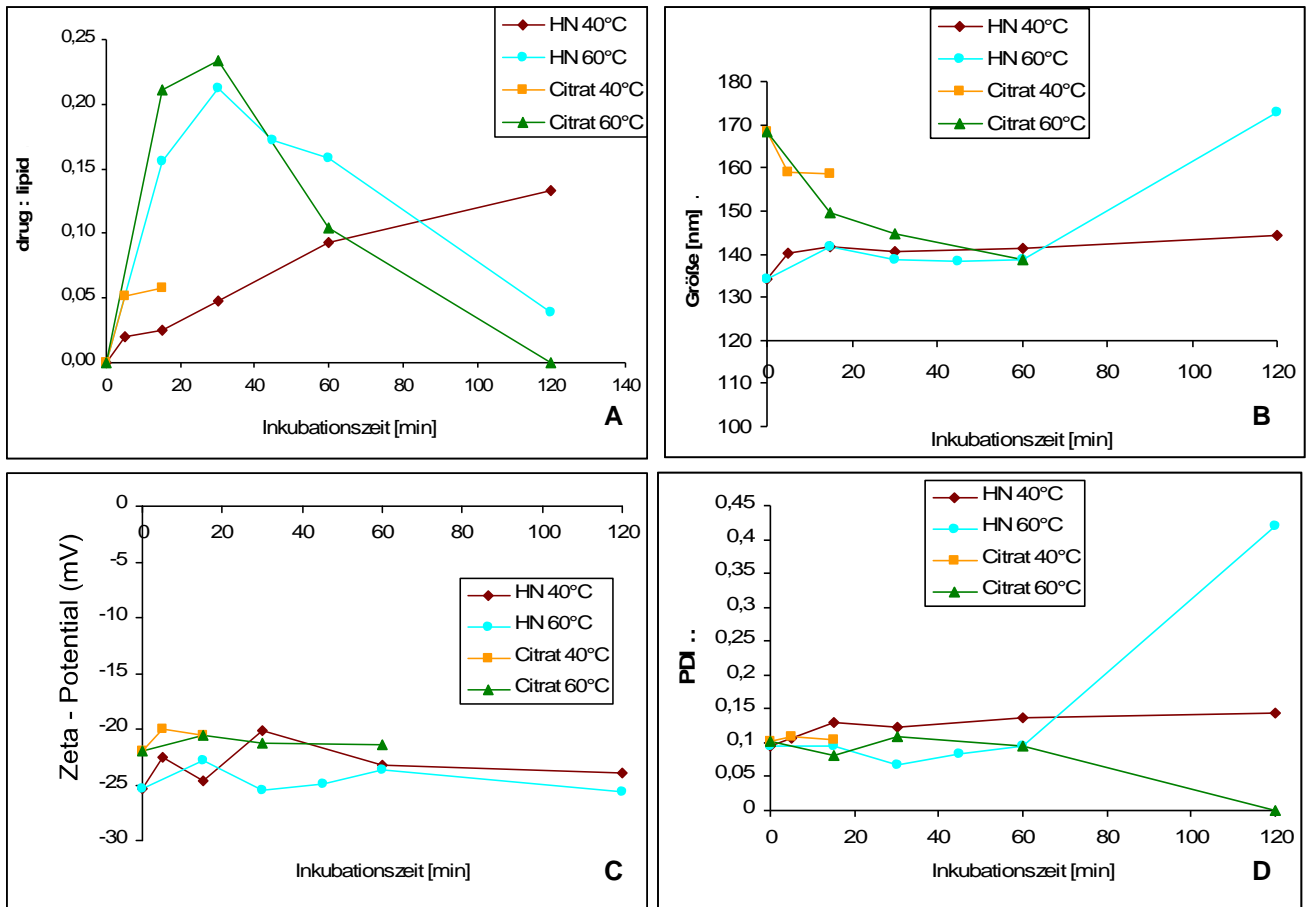
#### **3.1.9.4 Gemcitabineinschluss in HN-Puffer-haltige und Citrat-haltige Liposomen**

In nächster Instanz wurden HN-Puffer-haltige und Citrat-Puffer-haltige Liposomen auf ihre Eignung für den indirekten, temperaturgetriggerten Gemcitabineinschluss untersucht. Die nativen Liposomen enthielten dabei entweder HN-Puffer pH 7,4 oder Citratpuffer pH 4 (Abb. 3.17)

Die untersuchten Einschluss Temperaturen wurden auf 40°C und 60°C beschränkt, da niedrigere Temperaturen in den Vorversuchen schon wenig aussichtsreich waren und Temperaturen über 60°C nicht sinnvoll sind. Hier würde vor allem die vermehrte Entstehung von Lyso-Lipiden die Membraneigenschaften ungünstig verändern.

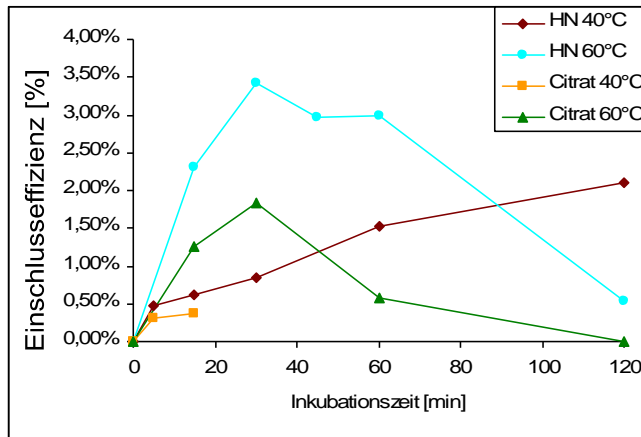
Die Versuchsreihe mit Citratliposomen bei 40°C Inkubationstemperatur wurde beendet, als keine deutliche Erhöhung des Drug:Lipid-Verhältnisses mehr zu erwarten war (Abb. 3.17). Diese Entscheidung beruht auf dem sehr ähnlichem Verhalten der beiden Liposomentypen in der 60°C-Versuchsreihe.

Während der Versuchsdurchführung fiel bereits auf, dass die Liposomen nicht wie die Glucose-haltigen Liposomen geleeartige Konsistenzveränderungen zeigten und auch die Säulenchromatographie problemlos möglich war.



**Abb. 3.17** Graphische Auswertung der Gemcitabin-Einschlussversuche in HN-Puffer-haltige und Citrat-Puffer-haltige Liposomen

Abb. 3.17 A zeigt ein optimales Drug:Lipid-Verhältnis für beide Liposomenlösungen nach 30-minütiger Inkubation bei 60°C, wobei die Citrat-haltigen Liposomen den HN-Puffer-haltigen überlegen waren. Die Qualitätsüberprüfung ergab eine höhere Stabilität hinsichtlich Größenverteilung, Oberflächenladung und PDI (Abb. 3.17 B, C und D) nach der Inkubation als es bei den Glucose-haltigen Liposomen der Fall gewesen ist. Lediglich nach Inkubationszeiten über 60 Minuten bei 60°C weisen die gemessenen Parameter auf eine erhöhte Inhomogenität der Lösungen hin, da Größenverteilung und PDI im Vergleich zu den anderen Proben deutlich klafften. Es wurden PDI >0,37 ermittelt, was laut Qualitätskriterien nicht akzeptabel war (vgl. Kapitel 3.1.7)



**Abb. 3.18** Einschlusseffizienz von HN-Puffer-haltigen und Citrat-Puffer-haltigen Liposomen im Vergleich.

Berechnung:

$$Eff[\%] = c_{Gem \text{ in TSL}} / 19 \text{ mg/dl}^* \cdot 100\%$$

\*Gemcitabinkonzentration bei Inkubation

Zusätzlich wurde die Einschlusseffizienz untersucht, das heißt wie viel freies Gemcitabin tatsächlich in die Liposomen aufgenommen wurde. Dazu wurde der Gemcitabingehalt der Lösungen vor sowie nach Inkubation und Säulenchromatographie zueinander in Beziehung gesetzt. Eindeutig hervorstechend waren dabei die Ergebnisse für die HN-Puffer-haltigen Liposomen nach 30-minütiger Inkubation bei 60°C mit einer Einschlusseffizienz von 3.42% (Abb. 3.18). Bei der Herstellung von HN-pufferhaltigen Gemcitabin-TSL unter Verwendung von höher konzentrierten Liposomendispersionen kann eine Einschlusseffizienz bis 4,63% erreicht werden (vgl. Tab. 3.3).

### 3.1.10 Zusammenfassung der Versuchsreihen zum indirekten Gemcitabineinschluss

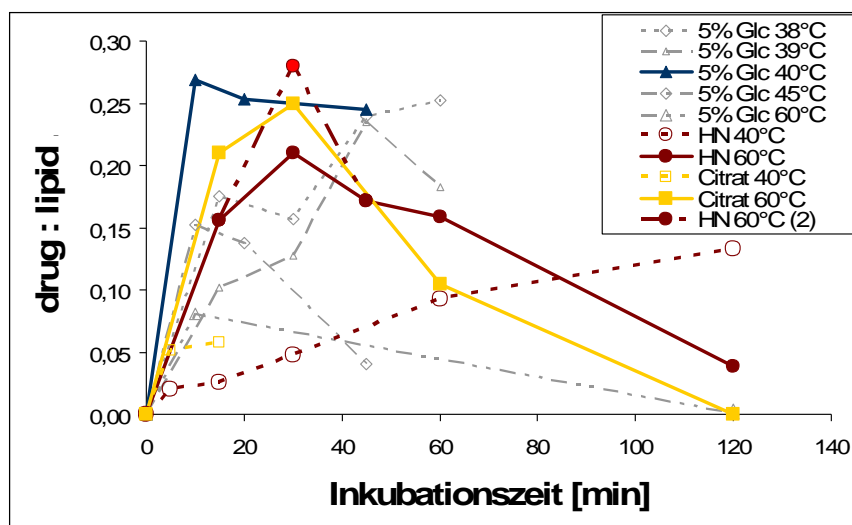
In der Zusammenschau aller Versuchsergebnisse des indirekten temperaturgetriggerten Gemcitabineinschlusses in thermosensitive Liposomen fällt auf, dass HN-Puffer-haltige Liposomen und Citrat-haltige Liposomen nach 30-minütiger Inkubation bei 60°C die besten Einschlussergebnisse zeigten, während für Glucose-haltige Liposomen nach 10 Minuten bei 40°C die besten Einschlusswerte erreicht wurden. Allerdings sind letztere kritisch zu behandeln, da die Glucose-haltigen Liposomen in der analytischen Auswertung oft widersprüchliche Ergebnisse aufwiesen und nicht den Qualitätskriterien entsprachen.

Bei wiederholten Versuchen mit HN-Puffer-haltigen Liposomen fiel auf, dass bei der Herstellung größerer Mengen (> 5 ml) das Drug:Lipid-Verhältnis um etwa 30% höher war als bei der Arbeit mit kleineren Probenmengen (~0,2 ml) im Rahmen des Auslotens der optimalen Versuchsbedingungen. Dieser nach oben korrigierte Wert wird in Abb. 3.19 zusätzlich berücksichtigt und dargestellt.

Bei den Citrat-haltigen Liposomen wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

Da sowohl die Liposomen auf HN-Puffer-Basis, als auch die auf Citrat-Puffer-Basis durchgehend stabile Versuchsergebnisse lieferten und in Hinblick auf Größenverteilung und PDI die geringste Varianz aufwiesen, kommen diese beiden Formulierungsvarianten in die engere Auswahl für die Messung der Temperaturöffnungsprofile.

Nachstehende Tabelle repräsentiert zwei Chargen von Gemcitabin-TSL auf HN-Puffer-Basis und solchen auf Citrat-Puffer-Basis.



**Abb. 3.19**

Zusammenfassung der Versuchsreihe zum indirekten temperatur-gesteuerten Gemcitabineinschluss.

Anmerkung:

Korrektur des Wertes von HN-Puffer-Liposomen auf Grundlage von weiteren Versuchsreihen mit diesem Liposomentyp.

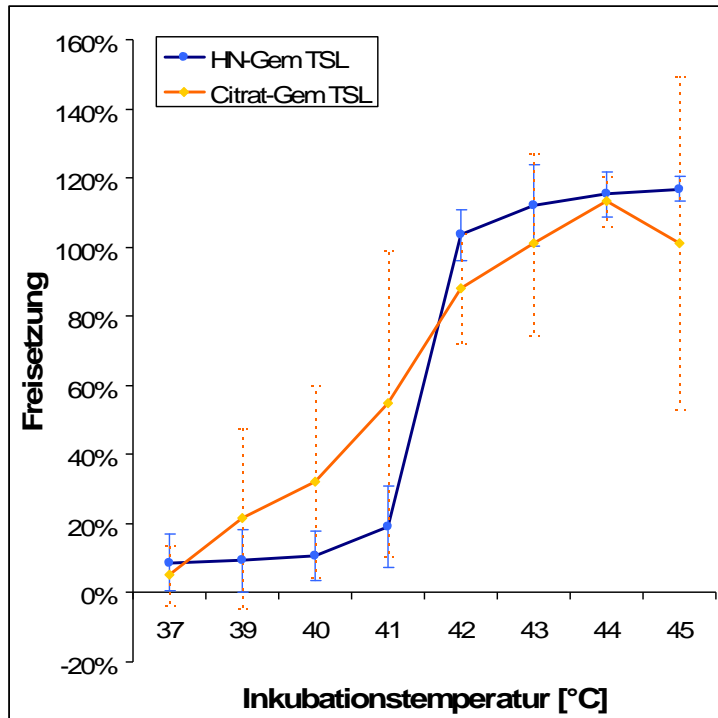
	Formulierung + Weiterverarbeitung	C <sub>Lipid</sub> [mM] SOLL	Einschluss = Hydratisierung des Lipidfilms/ Inkubation mit GemZar®	Extrusion / Porengröße [nm]	Säulen gg.	C <sub>Lipid</sub> [mM]	Größe [nm]	PDI	z-Potential [mV]	Einschluss = Gehalt [mM]	drug:lipid (m/m)	Einschluss- effizienz [%]
Gem-TSL (HN-Puffer-Basis)	DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)	50	<b>HN-Puffer pH 7,4</b>	200	(Ø Säulen erforderlich, da „native“ Liposomen)	28,9	146,5	0,160	-22,7			
	Indirektes Beladen  30 min / 60°C <i>Thermomixer</i>	28,9	1:1 (v/v) Verdünnung mit 38mg/ml Gemcitabin	x	<b>HN-Puffer pH 7,4</b>	10,5	146,1	0,142	-23,9	2,94	<b>0,28</b>	4,63
Gem-TSL (Citrat-Puffer-Basis)	DPPC/DSPC/DPPG <sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)	50	<b>300mM Citrat-Puffer pH 4</b>	200	(Ø Säulen; sofort nach Extrusion bei -20°C einfrieren!)	17,5	168,0	0,100	-22,0			
	Indirektes Beladen  30 min / 60°C <i>Thermomixer</i>	17,5	1:1 (v/v) Verdünnung mit 38mg/ml Gemcitabin	x	<b>HN-Puffer pH 7,4</b>	6,8	139,2	0,095	-23,1	1,73	<b>0,25</b>	2,73

**Tab 3.3** Gemcitabin-TSL auf HN-Puffer-Basis und Gemcitabin-TSL auf Citrat-Puffer-Basis im Vergleich.

### 3.1.11 Temperaturöffnungskurve

Zentraler Zielpunkt dieser Arbeit ist neben dem Einschluss von Gemcitabin in thermosensitive Liposomen auch die kontrollierte, temperaturgetriggerte Wirkstofffreisetzung.

Die Aufbereitung der Proben nach der Inkubation gestaltete sich anfänglich schwierig und fehleranfällig. Vor Allem die Absorptionsmessung zur Konzentrationsbestimmung lieferte zunächst unerklärbar hohe Maximalwerte für die Freisetzung bis der Einfluss des ACN auf die Messwerte nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.1.2). Der zu vermessenden Probe darf erst kurz vor der Messung das ACN zugesetzt werden um diese Verfälschung zum vermeiden. Nach Optimierung des Durchführungsprotokolls und durch routinierteren Umgang konnten reproduzierbare Ergebnisse erzeugt werden.



**Abb. 3.20**

Wirkstofffreisetzung in HN-Puffer nach 60 min Inkubation.

Gemittelte Temperaturöffnungskurven von thermosensitiven Gemcitabinliposomen auf HN-Puffer-Basis und thermosensitiven Gemcitabinliposomen auf Citrat-Puffer-Basis.

Die hohen Standardabweichungen bei den Citrat-Gem-TSL beruhen auf anfänglichen Messschwierigkeiten, die durch größere Messroutine ausgeglichen werden konnten.

(n = 4)

Der gewünschte Verlauf der Öffnungskurve findet sich bei den HN-Puffer-haltigen Gemcitabin-TSL. Diese Formulierung ist bis 41°C weitgehend temperaturstabil und zeigt nur eine geringe Freisetzung bei Temperaturen kleiner oder gleich 41°C. Bei 42°C kommt es zur raschen und vollständigen Wirkstofffreisetzung. Werte von 120% Freisetzung beruhen auf der Methodik des Versuchsaufbaus. Hauptsächlich wird die schon erwähnte Aufkonzentrierung während der Inkubation als Ursache betrachtet.

Die Citrat-Puffer-haltigen Gemcitabin-TSL präsentieren eine weniger sigmoidale Kurve. Bereits zwischen 40°C und 41°C ist eine erhöhte Wirkstofffreisetzung (>32%) zu beobachten. Zwischen 42°C und 45°C ist eine mit der HN-Puffer-haltigen Formulierung vergleichbare maximale temperaturgetriggerte Wirkstofffreisetzung messbar.

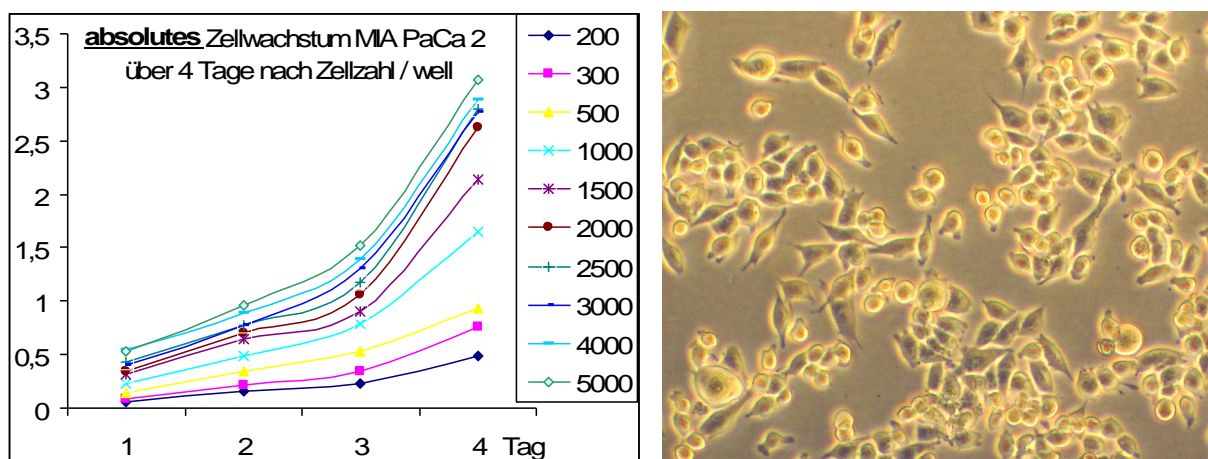
### 3.2 TEIL II – ZELLKULTUR

Bevor Versuche in einem Zellkulturmodell möglich waren, galt es, die genauen Wachstumseigenschaften der einzelnen Zelllinien zu ermitteln. Dazu gehören die Feststellung der idealen Zelldichte und die damit korrelierende Wachstumskurve. Dazu wurde das absolute Wachstum über vier Tage beobachtet und miteinander verglichen.

Das relative Wachstum im Vergleich zum ersten Tag und zum jeweiligen Vortag wurde betrachtet um den Zeitpunkt der exponentiellen Wachstumsphase abzugleichen. In dieser Phase sind die Zellen besonders empfindlich für zytotoxische Substanzen wie Gemcitabin. Gemcitabin hemmt direkt die DNA (und RNA-) Synthese und bringt den Zellzyklus damit zum Erliegen.

#### 3.2.1 MIA PaCa2-Zellen

Die MIA PaCa2 Zellen wurden aufgetaut und in Kultur genommen. Die ersten beiden Wachstumszyklen wurden genutzt um den Nährstoffverbrauch anhand der Indikatorfunktion des Mediums makroskopisch zu beobachten und einen geeigneten Rhythmus für das Splitten zu finden. Dazu wurde zusätzlich in 96-well-Platten das Wachstumsverhalten der Zelllinie mittels WST-Test quantifiziert.



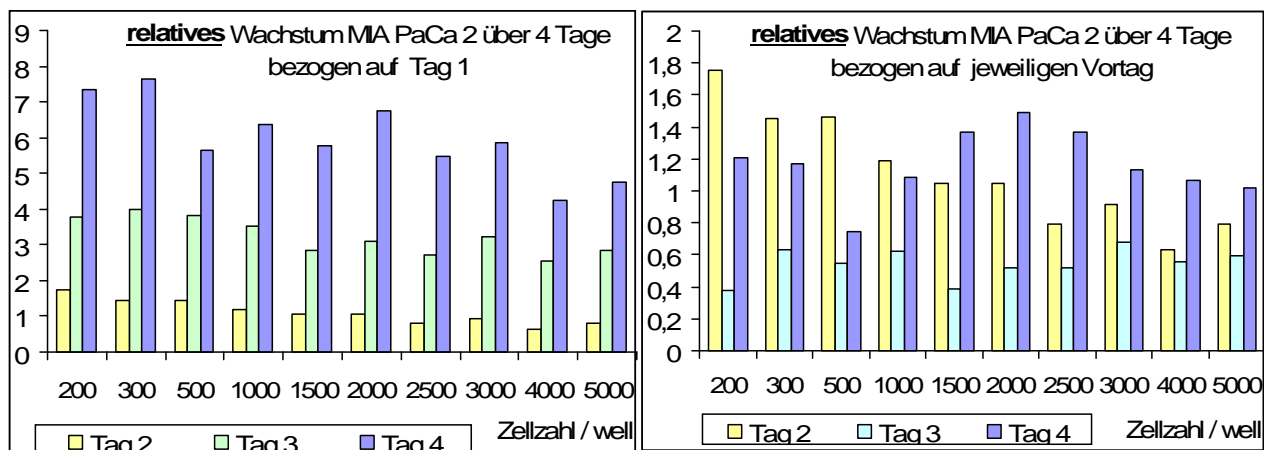
**Abb. 3.21** absolutes Wachstum von MIA PaCa2 Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen  
Rechts: MIA PaCa2 Zellen in Kultur an Tag 4 (Phasenkontrastmikroskop; 32-fach)

Aus Abb. 3.21 ist abzuleiten, dass eine Zelldichte zwischen 3000 und 5000 Zellen/well gut geeignet ist um ein exponentielles Wachstumsmuster zu erhalten.



Bei der täglichen mikroskopischen Kulturkontrolle konnte dies ebenfalls beobachtet werden: ab einer gewissen Zelldichte, schreitet das Wachstum rascher voran. Dafür können auto- und parakrine Mechanismen angenommen werden, sobald die Zellen in engerem Kontakt zueinander stehen, beziehungsweise sich im Nährmedium vermehrt Wachstumshormone anreicherten. War ein konfluenter Zellrasen erreicht, zeigt der Indikator des Nährmediums nahezu simultan einen Nährstoffmangel an.

Das relative Wachstum im Vergleich zum ersten Tag und zum jeweiligen Vortag zeigte, dass das Wachstum bei geringer Zellzahl pro well am stärksten ist (Abb. 3.22) und gibt damit Rückschlüsse auf die für die Toxizitätsversuche geeignete Zelldichte. Aus der Zusammenschau der optischen Beobachtung und der WST-gestützten Wachstumsbeobachtung wurde für die Toxizitätsversuche eine Zellzahl von 3000 Zellen/well festgelegt. Zudem wird deutlich, dass das Zellwachstum über 24 Stunden nicht konstant ist, sondern zwischen den einzelnen Tagen Schwankungen aufwies. Dies korrelierte mit dem Durchlaufen des Zellzyklus bei der Zellteilung, der offenbar zwei Tage beträgt. Der Zeitpunkt für eine Zytostatikabehandlung wird für den Tag 1 nach dem Aussähen gewählt um genau diese empfindliche Wachstumsphase zu erwischen.



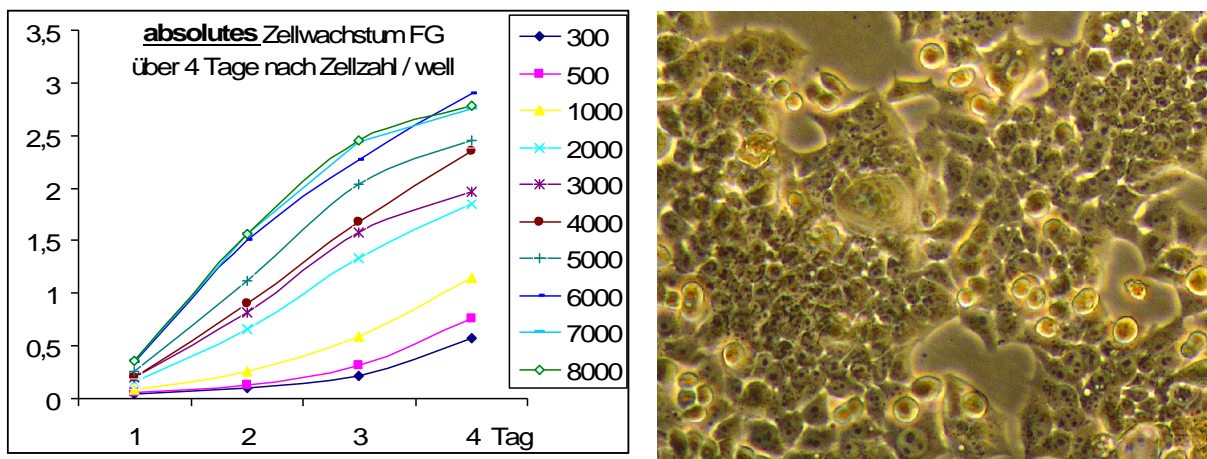
**Abb. 3.22** Analyse des relativen Wachstums der MIA PaCa2 Zellen mit unterschiedlichen Bezugspunkten (zu Tag 1 und zum jeweiligen Vortag)

### 3.2.2 FG-Zellen

Die FG-Zellen unterschieden sich mikroskopisch von den MIA PaCa2 vor allem durch die im Phasenkontrastmikroskop dunkel erscheinende zytoplasmatische Granula. Auch im Hinblick auf die Morphologie der Wachstumskolonien zeigten sich Unterschiede: so sind die

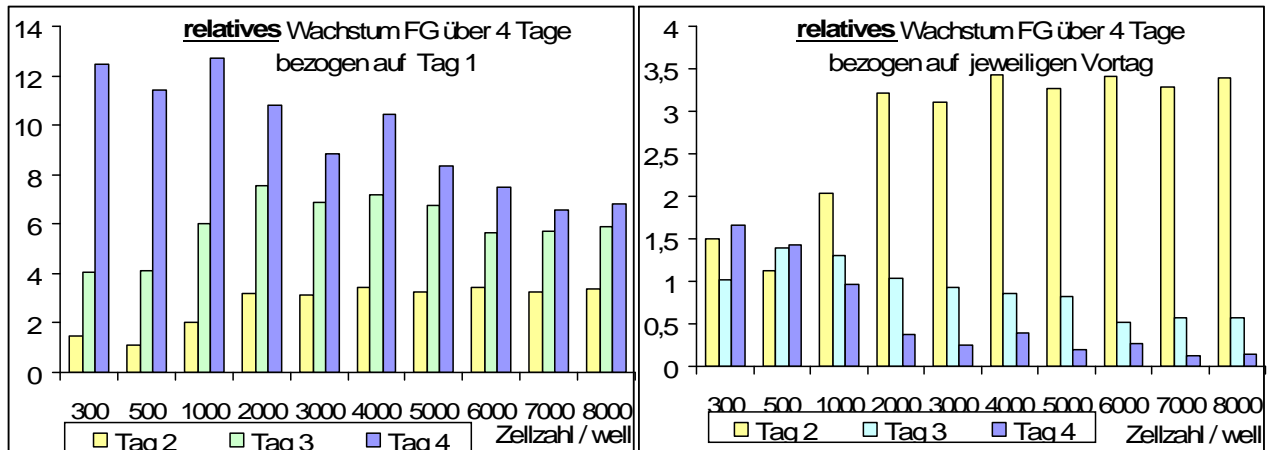
Zellklone einer Zelle immer sehr dicht nebeneinander und bilden in den Randzonen podienartige Zellausläufer zu benachbarten Kolonien. Eine höhere Zelldichte scheint für das Wachstum unerlässlich zu sein. Der Zellteppich kann eine komplette Konfluenz erreichen. Die Zellen sind sehr adhärent und ohne Zellschaber nicht vom Kulturflaschenboden zu entfernen.

Die Wachstumskurven verlaufen annähernd linear (Abb. 3.23). Für die Toxizitätsversuche wird eine Zelldichte von 5000 Zellen/well gewählt, da bei geringeren Zellzahlen zwar die Wachstumskurve steiler ist, die Genauigkeit des WST-test durch die geringe Zellmenge aber beeinträchtigt ist.



**Abb. 3.23** absolutes Wachstum von FG Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen.  
Rechts: FG Zellen in Kultur an Tag 4 (Phasenkontrastmikroskop; 32-fach)

Der Vergleich des relativen Wachstums bestätigt die Vermutung, dass bei geringen Zellzahlen das Wachstum am stärksten ist ((Abb. 3.24). Zusätzlich zeigt sich im Vergleich zum Vortag, dass bei einer höheren Zelldichte von >2000 Zellen pro well das Wachstum von Tag 1 auf Tag 2 am größten ist, wohingegen das Wachstum bei geringere Zellzahl im Vergleich zum Vortag eher gleich bleibend ist. Dies kann sich bei der Gemcitabinbehandlung von Nutzen gemacht werden, da die Zellen bei einem Behandlungsbeginn an Tag 1 in ihrer empfindlichen Phase erreicht werden.



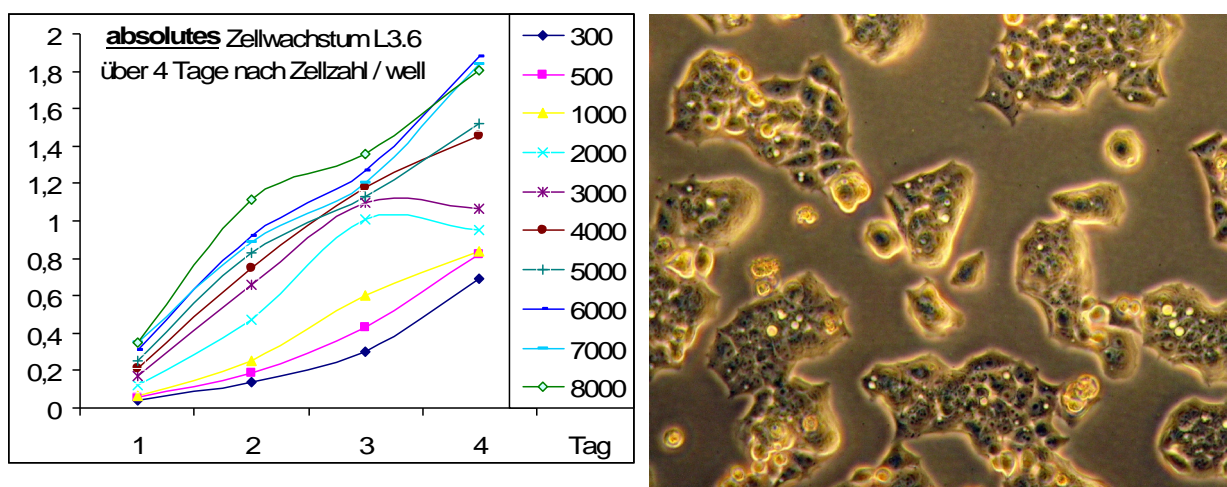
**Abb. 3.24** Analyse des relativen Wachstums der FG - Zellen mit unterschiedlichen Bezugs-punkten (zu Tag 1 und zum jeweiligen Vortag)

### 3.2.3 L3.6-Zellen

Da sich die L 3.6 Zellen von den FG-Zellen ableiten, sind sie sowohl morphologisch als auch in ihrem Wachstumscharakter den FG-Zellen ähnlich (Abb. 3.25). Die Zellklone stehen in sehr engem Kontakt zueinander und bilden dichte Koloniehäufen.

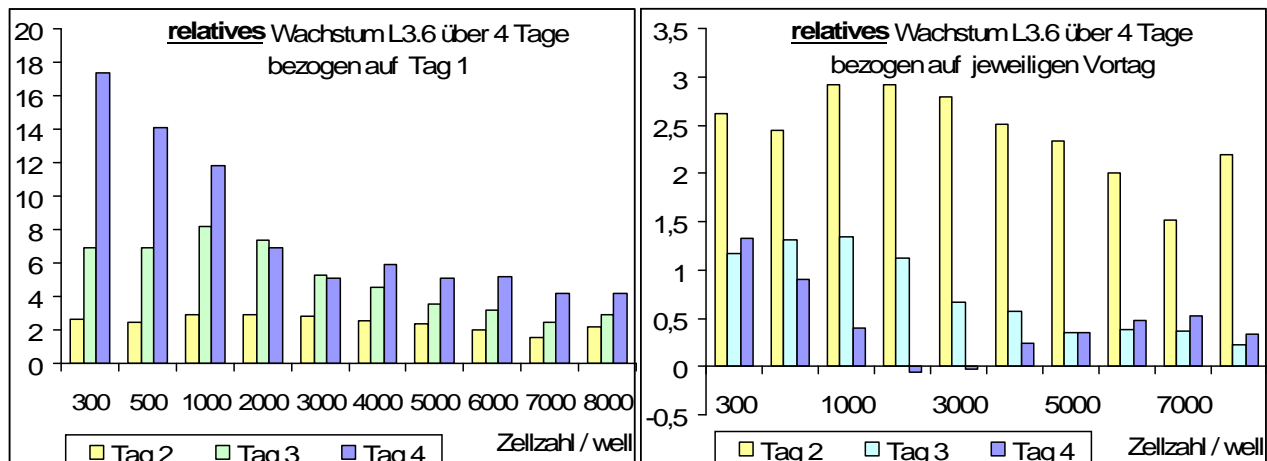
In der Phasenkontrastmikroskopie fällt allerdings auf, dass die L 3.6-Zellen nicht so rasch konfluent wachsen und die einzelnen Zellfelder länger als die FG-Zellen eigenständig bleiben, also keine Zellbrücken zwischen den Kolonien entstehen.

Bei einer zu geringen Zelldichte ist aufgefallen, dass sich keine Konfluenz einstellt ehe das Nährmedium durch Farbumschlag den Verbrauch der Nahrungszusätze anzeigt.



**Abb. 3.25** absolutes Wachstum von L 3.6 Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen.  
Rechts: L 3.6 Zellen in Kultur an Tag 4 (Phasenkontrastmikroskop; 32-fach)

Diese Beobachtung kann durch den WST-Zellproliferationstest bestätigt werden: bei geringer Zelldichte ist die Wachstumskurve am steilsten, während sie bei höheren Zelldichten eher flach verläuft. Anders als bei den FG-Zellen zeigt die höchste Proliferationsrate bei allen Zelldichten von Tag 1 auf Tag 2 (Abb. 3.26), sodass auch hier der erste Tag nach dem Aussähen als ideal für die Gemcitabinbehandlung angesehen werden kann.



**Abb. 3.26** Analyse des relativen Wachstums der L 3.6 - Zellen mit unterschiedlichen Bezugspunkten (zu Tag 1 und zum jeweiligen Vortag)

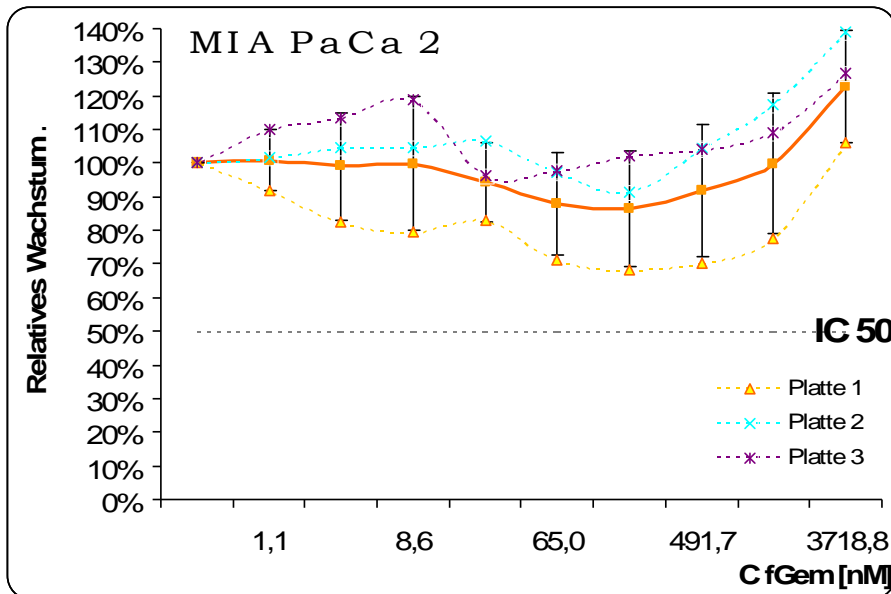
### 3.2.4 Gemcitabinbehandlung mit freiem Wirkstoff - Ermittlung der $IC_{50}$

Die Gemcitabinempfindlichkeit soll zunächst mit freiem Wirkstoff eingegrenzt werden um einen Anhaltspunkt für die benötigte Gemcitabinosis zu erhalten, bei der die Hälfte der Zellen sicher apoptotisch werden, die  $IC_{50}$ .

#### 3.2.4.1 MIA PaCa2

Schon bei der mikroskopischen Kontrolle der Kulturen in den 96-well-Platten fällt auf, dass die Zellen trotz Gemcitabinbehandlung noch recht gleichmäßige Kulturen bilden, wenn auch nicht so dicht wie ohne Gemcitabin. Der WST-Test stützt diese Beobachtung: die MIA PaCa2-Zellen erreichen bei keinem Versuchsdurchlauf die  $IC_{50}$ -Marke (Abb. 3.27).

Der  $IC_{50}$  liegt also bei einer Gemcitabinkonzentration  $>3719$  nM. Die Zelllinie kann somit als unempfindlich gegenüber Gemcitabin angesehen werden.



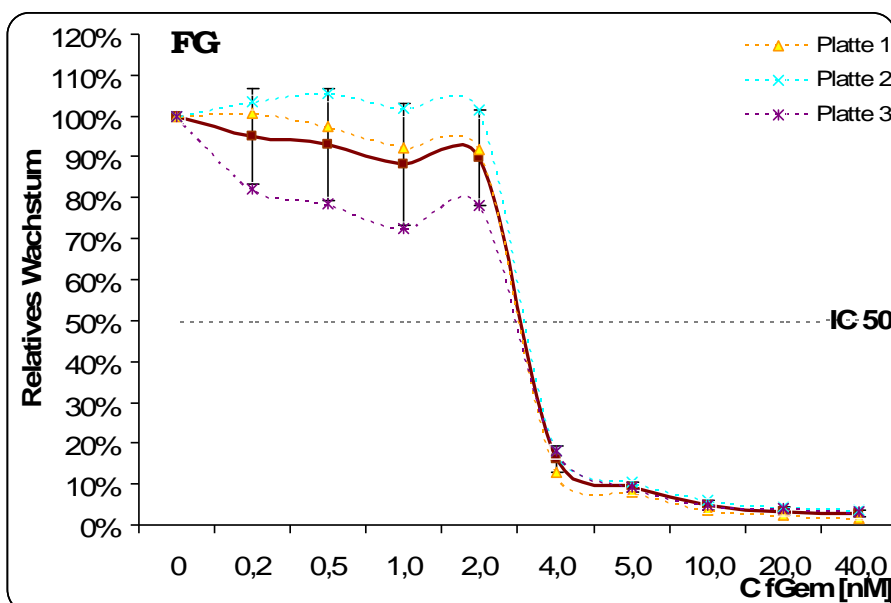
**Abb. 3.27**  
Gemcitabinempfindlichkeitsprüfung der MIA PaCa2 Zelllinie.

Behandlung der Zellen an Tag 1 nach dem Aussähen.  
WST-Test an Tag 4.  
Zur Auswertung wurde der 2-Stunden-Wert verwendet.

(n = 3)

### 3.2.4.2 FG

Im Vorversuch zur Gemcitabinempfindlichkeit fiel bereits auf, dass schon geringe Dosen Gemcitabin zytotoxisch auf die FG-Zellen wirken. Bei der weiteren Eingrenzung des Dosisspektrums kann die IC<sub>50</sub> auf einen Wert zwischen 2 nM und 4 nM Gemcitabin begrenzt werden (Abb. 3.28). Im Phasenkontrastmikroskop präsentieren sich nur noch sehr vereinzelt vitale Zellen bei Gemcitabinkonzentrationen >4 nM. Die apoptischen Zellen sind kugelig und nicht länger adhärent, sodass sie im Medium frei schwimmen.



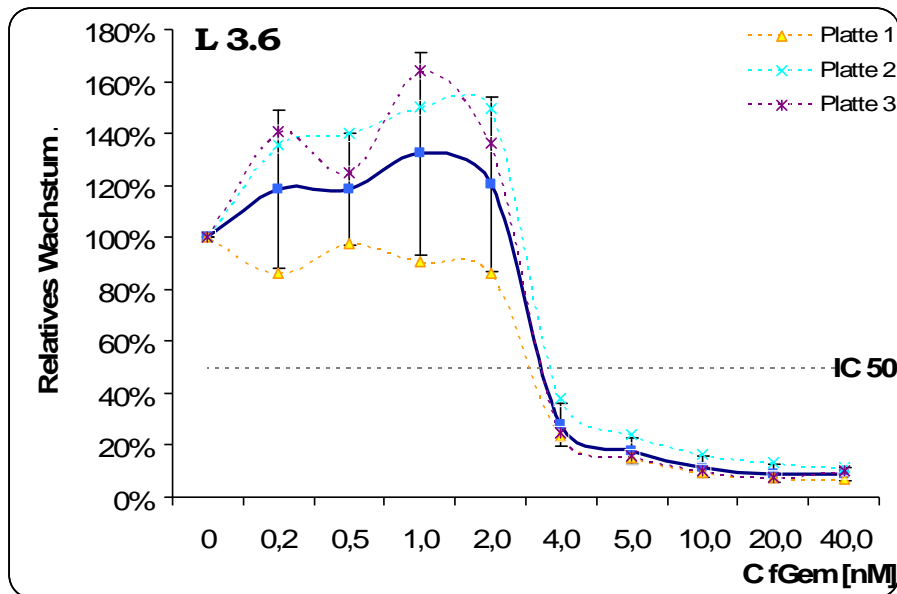
**Abb. 3.28**  
Gemcitabinempfindlichkeitsprüfung der FG Zelllinie.

Behandlung der Zellen an Tag 1 nach dem Aussähen.  
WST-Test an Tag 4.  
Zur Auswertung wurde der 2-Stunden-Wert verwendet.

(n = 3)

### 3.2.4.3 L 3.6

Ähnlich wie die FG-Zellen sind die L 3.6 Zellen sehr empfindlich für Gemcitabin. Auch hier liegt die  $IC_{50}$  zwischen 2 nM und 4 nM (Abb. 3.29). Mikroskopisch imponieren ebenfalls die abgestorbenen Zellen als frei schwimmende Zellaggregate.



**Abb. 3.29**  
Gemcitabinempfindlichkeitsprüfung der L 3.6 Zelllinie.

Behandlung der Zellen an Tag 1 nach dem Aus-sähen.  
WST-Test an Tag 4.  
Zur Auswertung wurde der 2-Stunden-Wert verwendet.

(n = 3)



## DISKUSSION

Die Arbeitsgruppe Liposomen hat schon mit Doxorubicin-beladenen thermosensitiven Liposomen bewiesen, dass temperaturgesteuerte Wirkstofffreisetzung ein viel versprechendes Modell für die gezielte zytostatische Therapie solider Tumoren darstellt (Schmidt 2011). Gemcitabin ist ein in der Klinik fest etabliertes Zytostatikum im Bereich der Chemotherapie von Pankreaskarzinomen, Urothelkarzinomen, aber auch des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC, non small cell lung cancer), des Mammakarzinoms, des Ovarialkarzinoms, sowie bei Rezidiven von Lymphomen (Gemzar® Fachinformation, Eli Lilly, USA). Wie bei vielen anderen Chemotherapeutika, ist auch eine Gemcitabintherapie, sei es eine Monotherapie oder in Kombination mit anderen Zytostatika mit für den Patienten oftmals äußerst belastenden Nebenwirkungen vergesellschaftet. Ziel dieser Arbeit war deswegen einen ersten Schritt in Richtung lokaler Tumorbekämpfung mit Gemcitabin zu machen, indem das erprobte Modell der thermosensitiven Liposomen genutzt und für diesen Wirkstoff modifiziert wurde.

### 4.1 TEIL I – HERSTELLUNG UND ANALYTIK VON GEMCITABIN-TSL

#### **Thermosensitive Liposomen aus DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (m/m)**

In dieser Arbeit wurden cholesterinfreie TSL auf der Basis von DPPC und DSPC verwendet. Cholesterin verändert die ‚Starrheit‘ oder ‚Fluidität‘ der Liposomenmembran: je mehr Cholesterin enthalten ist, desto ‚fluider‘ wird die Membran (New 1997). Die erhöhte Membranstabilität hat zudem Einfluss auf die Phasenumwandlung bis hin zu deren Aufhebung (New 1997). Cholesterin verringert des Weiteren die Bindung von Plasmaopsoninen und vermindert so den schnellen Abbau der Liposomen in vivo (Drummond et al. 2008).

Cholesterinfreie TSL ermöglichen dagegen eine Einstellung der Phasenumwandlungstemperatur zwischen 40°C und 42°C; der verringerten Membranstabilität wird durch Erhöhung des DSPC-Anteils entgegengewirkt (Hossann et al. 2007). Die Zugabe von DPPG<sub>2</sub> wirkt zusätzlich destabilisierend, bei gleichzeitiger Verlängerung der Zirkulationszeit (Lindner et al. 2004).

Das in dieser Arbeit verwendete Lipidverhältnis DPPC/DSPC/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (mol/mol) wurde von Lindner et al. 2004 als optimal beschrieben und fand deshalb auch Anwendung in der vorliegenden Arbeit.



#### 4.1.1 Größe der Vesikel

Die verwendeten Liposomen hatten trotz Extrusion durch Filtermembranen mit einem Durchmesser von 200nm einen tatsächlichen Durchmesser von 140nm bis 150nm bei einem angenommenen, durch die Porengröße der Filtermembran bei der Extrusion vorgegebenen Durchmesser von 200nm. Diese Abweichung ist bekannt (Hossann et al. 2010). Temperaturempfindlichkeit und Zirkulationszeit korrelieren proportional zur Größe der Liposomen, wohingegen die Phasenumwandlungstemperatur der einzelnen Phospholipide nicht von der Größe abhängig ist (Hossann et al. 2010). Je geringer der Vesikeldurchmesser ist, desto niedriger ist die Temperaturschwelle, bei welcher eine maximale Wirkstofffreisetzung stattfindet (Hossann et al. 2010). Konkret heißt das: am Beispiel der CF-Liposomen hat sich in einem Größenintervall von 127nm bis 159nm eine vergleichbare, stabile Wirkstofffreisetzung in einem Temperaturbereich von 37°C bis 45°C gezeigt (Hossann et al. 2010). Allerdings ist bekannt, dass die chemischen Eigenschaften des eingeschlossenen Wirkstoffs, sowie die Größenverteilung selbst zusätzlich die Freisetzungseigenschaften beeinflussen (Hossann et al. 2010). Daraus folgt, dass vor einer in vivo Verwendung das individuell günstigste Größenverhältnis einer wirkstoffbeladenen TSL-Formulierung ermittelt werden muss (Hossann et al. 2010). Zudem verachtfacht sich das Einschlussvolumen bei Verdoppelung des Liposomendurchmessers. Für Doxorubicin- und Kontrastmittelhaltige TSL hat sich ein Vesikeldurchmesser um 150nm als effizient erwiesen (Hossann et al. 2010). Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde für diese Arbeit die Größe der Liposomen festgelegt. Nach der Extrusion unter Verwendung Filters mit 200nm Porengröße lag der mittlere Vesikeldurchmesser der Gemcitabin-TSL auf HN-Pufferbasis bei  $144,9 \pm 11,1$ nm und derjenige der Gemcitabin-TSL auf Citratpufferbasis bei  $154,9 \pm 16,1$ nm.

#### 4.1.2 pH-Metrie

Der pH-Wert einer Lösung hat einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität der Liposomen. Abhängig vom pK-Wert liegen die Lipide der Liposomenmembran in ihrer protonierten oder unprotonierten Form vor, was sich wiederum auf die thermischen und chemischen Eigenschaften der Liposomen auswirkt (P. Kaufmann-Kolle 1986). Entscheidend ist die Tatsache, dass die Phasenumwandlungstemperatur durch den pH-Wert beeinflusst wird (Träuble, Eibl 1974). Im Umkehrschluss hat eine pH-Änderung direkten Einfluss auf die Phasenumwandlung und kann diese auch isotherm induzieren (siehe Kapitel 1.1.3.1). In Hinblick auf die verwendeten TSL zur Gemcitabin-TSL Herstellung kann dieser Sachverhalt ein Hinweis auf die Unterschiede der Öffnungskurven von HN-Puffer-haltigen Gemcitabin-



TSL und Citrat-Puffer-haltigen Gemcitabin-TSL sein. Bei einem pH von 4 werden Lipide vermehrt hydrolysiert als dies bei einem pH von 7,4 der Fall ist.

Des Weiteren müssen pH-Gradienten bedacht werden, die zwischen dem Liposomeninneren und -äußeren auftreten können. In Kombination mit der veränderten Fluidität der Lipidmembranen kann ein solcher Gradient zu einem ‚Leck‘ in den Liposomen führen und eingeschlossener Wirkstoff vorzeitig verloren gehen (New 1997). Dies wirkt sich letztlich auch auf die Halbwertszeit des Wirkstoffs in den beladenen Liposomen aus und muss zusätzlich bei der Lagerung beachtet werden.

#### **4.2 2'-DEOXIURIDIN (DU)**

Da der Wirkstoff Gemcitabin schon in geringen Mengen sehr toxisch ist und die einfache Handhabung im Labor erschwert, wurden zunächst einige Versuche zur Charakterisierung mit dem sehr strukturverwandten Pyrimidinanalogon 2'-Deoxiuridin durchgeführt. Diese Substanz wird im weiteren Verlauf bei Verwendung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (= HPLC) als interner Standard verwendet (in Anlehnung an Lanz et al, 2008).

#### **4.3 GEMCITABINNACHWEIS**

Die photospektroskopische Konzentrationsbestimmung von Gemcitabin hat sich in dieser Arbeit als effiziente und einfache Methode herausgestellt. Allerdings ist der Nachweis von in Liposomen eingeschlossenem Gemcitabin nur möglich, wenn die Liposomen zuvor zerstört und die Lipide durch ACN-Extraktion aus der Lösung entfernt wurden, da diese auch im Bereich der UV-Absorption vom Gemcitabin ebenfalls Absorption zeigen. Dies ist bei der Charakterisierung der Liposomen nicht weiter hinderlich, stellt aber bei der Analyse des Temperaturöffnungsverhaltens eine aufwendigere Aufbereitung der Proben dar, um gezielt das nach Inkubation noch eingeschlossene oder alternativ das freigesetzte Gemcitabin zu bestimmen. Dazu wurden die Liposomen bei 48.000 x g abzentrifugiert und im entstandenen Überstand die Menge des freigesetzten Gemcitabins bestimmt.

Die HPLC stellt dabei ein sensitive Messinstrument dar, welches als Standardverfahren auf Basis der durch die Photospektrometrie gewonnen Erkenntnisse unter Verbesserung der Aufbereitungsmethoden bei der Fortführung der Untersuchungen mit Gemcitabin-TSL in der Arbeitsgruppe genutzt werden soll.

Inspiziert von Arbeiten zur Aminosäureanalytik wurden drei Reagenzien zum Gemcitabinnachweis experimentell getestet: Fluorescamin, o-Phthalaldehyd-ethanethiol und Ninhydrin (Daten nicht gezeigt). Dabei sollte sich die primäre Aminogruppe des

Gemcitabins zu Nutze gemacht werden, da die genannten Reagenzien mit primären Aminen fluoreszierende Verbindungen bilden, welche dann mittels Fluoreszenzspektrometrie oder HPLC nachgewiesen werden können (Benson et al. 1975; Hanczkó et al. 2007; Udenfriend et al. 1972). Dies hätte die simultane Beobachtung der Gemcitabinfreisetzung aus den Liposomen während der Inkubation ermöglicht, allerdings wurden bei den Vorversuchen keine suffizienten Ergebnisse erzielt, die diese Reagenzien hätten in Betracht kommen lassen. Ursächlich angenommen wird, dass wohl keine Derivatisierung des zwar primären aber aromatisch gebundenen Amins des Gemcitabins stattfindet.

Inzwischen ist in der Arbeitsgruppe eine HPLC-Methode zum Gemcitabinnachweis aufbauend auf die Erkenntnisse dieser Arbeit etabliert worden.

#### **4.4 HALTBARKEIT VON GEMCITABIN**

Die innerhalb einer Charge über fünf Monate durchgeführten Untersuchungen der UV-Absorption bei festgelegten Gemcitabinkonzentrationen, hat einen unveränderten Verlauf der Absorptionskurve gezeigt. Dies spricht zwar dafür, dass auch nach knapp einem halben Jahr Lagerung bei +4°C der Wirkstoff noch gleichermaßen vorhanden ist, allerdings kann eine chemische Stabilität nicht sicher nachgewiesen werden. Die eng beieinander liegenden Absorptionsmaxima der strukturverwandten Stoffe dU und Gemcitabin legen nahe, dass auch ein Zerfallsprodukt von Gemcitabin den Fortbestand eines intakten Gemcitabin-Moleküls vortäuschen könnte. Die angewendete Methode der UV/VIS Spektrometrie ist allerdings nicht sensitiv genug um dies zu untersuchen.

Ein *in vivo* Experiment in der Zellkultur zeigte allerdings, dass die Zellen bei Verwendung einer über 3 Wochen bei +4°C gelagerten Charge nicht apoptotisch geworden sind (Daten sind nicht dargestellt). Dies lässt vermuten, dass Gemcitabin bei Lagerung bei +4°C seine zytotoxische Wirksamkeit verliert. *Lege artis* wurde sowohl in allen *in vitro* als auch in den *in vivo* Versuchen entweder frisch von der Apotheke geliefertes oder bei -20°C gelagertes Gemcitabin verwendet.

#### **4.5 METHODEN FÜR DEN WIRKSTOFFEINSCHLUSS IN TSL**

In diversen Publikationen werden unterschiedliche Varianten des Wirkstoffeinschlusses in verschiedenen Liposomenformulierungen beschrieben (Lindner et al. 2004, Hossann et al. 2007, Bornmann et al. 2008, Celano et al. 2004, Cosco et al. 2009, Massing et al. 2007). Als übergeordnete Abgrenzung dieser Methoden kann ein direkter von einem indirekten Einschluss unterschieden werden. Der direkte Einschluss ist dabei so definiert, dass darunter das einfache Auftragen des Wirkstoffs auf den Lipidfilm verstanden

wird. Dies ist mit CF problemlos praktikabel (Lindner et al. 2004). Der Vorversuch mit dU hat allerdings gezeigt, dass dieser direkte Einschluss nicht zu einem zufrieden stellenden Ergebnis führen muss: die resultierende Dispersion ist sehr viskös. Nach der Extrusion bleiben die Partikel bei der Säulenchromatographie oben auf den Säulen hängen, sodass keine verwertbaren Dispersionen für die weitere Analytik gewonnen werden konnten. Es wird spekuliert, dass sich höhermolekulare Strukturen zwischen dU und den Liposomen gebildet haben, da diese per se eine Oberflächenladung besitzen und somit intermolekulare Wechselwirkungen denkbar machen. Dass solche Wechselwirkungen durchaus auftreten, wurde von Moog et al. 2000 schon beschrieben (siehe 5.4.3). Weil auch Gemcitabin in wässriger Lösung einen sauren pH aufweist, wird dieses Phänomen hier ebenfalls angenommen und somit der direkte Einschluss als Möglichkeit verworfen.

Die Herausforderung dieser Arbeit bestand vor allem darin, Gemcitabin in thermosensitive Liposomen einzuschließen, die sich in ihrer Formulierung von den bis dato publizierten nicht-thermosensitiven Gemcitabin-haltigen Liposomen dahingehend unterscheiden, dass sie kein Polyethylenglycol (PEG) und/oder Cholesterin enthalten sondern statt dessen DPPG<sub>2</sub>. DPPG<sub>2</sub> ist in diesem Fall die Komponente, die für die besondere Eigenschaft der Thermosensitivität verantwortlich ist, sowie eine hohe Wirkstofffreisetzung bei langer Zirkulationszeit ermöglichen (Lindner et al. 2004, Hossann et al. 2007).

Es wurden hauptsächlich zwei verschiedene Formen von liposomalen Gemcitabin getrachtet, die von anderen Gruppen vorgestellt wurden: zum einen eine Formulierung mit DPPC/Cholesterin/DSPE-MPEG-2000 (N-(carboxyl-methoxypolyethylenglycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) mit einem molaren Verhältnis von 8:3:1 (Celano et al. 2004) oder einem molaren Verhältnis von 6:3:1 (Cosco et al. 2009) und zum anderen eine Formulierung mit EPC3 (Eier-Phosphatidylcholin)/Cholesterin (55:45 m/m) (Bornmann et al. 2008, Massing et al. 2008). Die genannten Zusammensetzungen haben wie auch die Gemcitabin-TSL das Ziel den rapiden enzymatischen Abbau im Plasma zu Verhindern, jedoch ist keine der Formulierungen für eine thermisch getriggerte Freisetzung geeignet.

In der Literatur wird die Methode der ‚dualen asymmetrischen Zentrifugation‘ zum Beladen nicht-thermosensitiver Liposomen auf Cholesterin- und EPC3-Basis beschrieben (Hirsch et al. 2009). Dies ist ein seit den 70er Jahren bekanntes Prinzip um zwei visköse Komponenten schnell und effektiv miteinander zu verbinden (Massing et al. 2008). Diese Methode wird vorerst aufgrund der fehlenden zur Liposomenbeladung geeigneten Gerätschaften nicht mit

in Betracht gezogen, da es sich hierbei um ein Einzelstück im Labor von U. Massing handelt (persönliche Mitteilung U. Massing an M. Hossann).

Für einen indirekten Einschluss können neben den rein physikalischen Kräften auch die chemischen Eigenschaften verschiedener Lösungsmittel und Wirkstoffe genutzt werden, wie zum Beispiel pH-Gradienten, osmotische Gefälle, Oberflächenladungen, Ethanolinjektion oder Phasentransitionstemperaturen (New 1997). Darüber ist die Kombination bekannter Modelle denkbar und wurde, soweit praktikabel, erprobt.

In verschiedenen Publikationen wird wiederholt eine Temperaturerhöhung durch Inkubation genutzt um den Wirkstoff in intakte Liposomen einzuschließen (Celano et al. 2004, Graeser et al. 2009). Diese Methode liegt nahe, da bei Temperaturverschiebungen die Permeabilität der Lipiddoppelschichten verändert wird und dies vor allem für den Einschluss polarer Moleküle oder Ionen in Betracht gezogen werden kann (New 1997).

Im Vorversuch konnte bewiesen werden, dass ein temperaturgetriggertter Einschluss von CF in thermosensitive Liposomen mit der Formulierung DSPC/DPPG/DPPG<sub>2</sub> 50:20:30 (mol/mol) nach 120 Minuten Inkubation bei 60°C am erfolgreichsten war. Die nativen Liposomen waren mit 0,9% NaCl gefüllt, was ein ungepuffertes System in einer physiologischen und weitläufig zu Injektionszwecken verwendeten Lösung repräsentiert. Werden die Stoffeigenschaften von CF betrachtet, so liegt auch hier ein nahezu neutraler pH von 7,2 vor. Einzige Einflussgröße auf den Einschluss scheint daher der Temperaturunterschied zu sein.

Im Fall vom Gemcitabin gestaltet sich dies vielschichtiger: die genauen intermolekularen Interaktionen zwischen der negativ geladenen Liposomenoberfläche und den Gemcitabinmolekülen sind nur hypothetisch zu diskutieren, da sie allenfalls indirekt in Form von Rückschlüssen aus Beobachtungen der Experimente heraus erklärt werden können. Aufgrund der fehlenden Erfahrung mit dem Einschluss von Gemcitabin in thermosensitive Liposomen, wurden mehrere Lösungsansätze gestützt auf Literaturangaben erprobt.

#### **4.5.1 Glucose-5%-Liposomen als Basis der Gemcitabin-TSL**

Glucoselösungen sind gängige Trägersubstanzen in der klinischen Anwendung von Zytostatika. Darüber hinaus wird ein ‚passives Beladen‘ von präformierten nicht-thermosensitiven Liposomen, die eine Mannitol-5%, ebenfalls eine Zuckerlösung, enthalten als erfolgreich beschrieben (Bornmann et al. 2008).

In Anlehnung daran wurde zunächst ein temperaturgetriggertter Einschluss von Gemcitabin in Glucose-5%-haltige Liposomen erprobt. Die in der Literatur beschriebenen Inkubationsbedingungen von 2 Stunden bei 60°C galten als Orientierungshilfe für das eigene Versuchsdesign. Schnell fiel auf, dass je länger die Liposomendispersionen mit Gemcitabin inkubiert wurden, die Dispersionseigenschaften verändert wurden. Inkubationen von mehr als einer Stunde Dauer führten zu nicht weiter analysierbaren Lösungen, da es nicht möglich war, den nicht eingeschlossenen Wirkstoff via Säulenchromatographie zu extrahieren.

Der Einschluss war bei 40°C nach 10 Minuten Inkubation am erfolgreichsten. Bei mehrfacher Wiederholung des Einschlusses fiel allerdings eine Varianz zwischen den Drug:Lipid Wert um bis zum Faktor 2 bei gleich bleibenden Versuchsbedingungen auf.

Da auch in weiteren Versuchen nicht wieder derartig hohe Werte wie im Vorversuch erreicht werden konnten, werden ein Aufbereitungsfehler, Messungenauigkeiten und etwaige höhermolekulare Einflüsse wie das Anhaften von Gemcitabinmolekülen an der Liposomenhülle diskutiert. Dies würde die hohen Messwerte erklären und zudem noch eine Quervernetzung zwischen den Liposomen in Betracht kommen lassen, was in der Konsequenz wiederum eine Erklärung für die makroskopisch sichtbaren Veränderungen der Lösungen sein kann.

Zusätzlich wurde vermutet, dass der unterschiedliche Lipidgehalt der Ausgangslösungen dafür verantwortlich ist, was im Anschluss genauer untersucht wurde. Tatsächlich ist der Einschluss bei Lipidkonzentrationen ab 10mM effizienter als bei stark verdünnten Lösungen. Bei der Qualitätsüberprüfung zeigten die Glucose-5%-Gemitabin-TSL zudem immer einen PDI zwischen 0,3 und 0,4, was für eine breite Größenverteilung und somit eine größere Inhomogenität der Dispersionen spricht.

Aufgrund dieser Beobachtungen, wurde von weiteren Versuchen mit Glucose-5%-haltigen Liposomen als Basis der Gemcitabin-TSL abgesehen.

#### **4.5.2 HN-Puffer- und Citrat-Puffer-Liposomen als Basis der Gemcitabin-TSL**

Die Glucose-5%-Liposomen stellten ein ungepuffertes System bei schwach saurem pH von etwa 5 dar. In einigen Publikationen wird ein pH-Gradient genutzt um Gemcitabin in Liposomen einzuschließen beziehungsweise ein ‚Leck‘, das heißt einen ungewollten frühzeitigen Wirkstoffaustritt durch Protonierung zu vermeiden (Celano et al. 2004; Cosco et al. 2009; Paolino et al. 2010). In Anlehnung daran wurden ebenfalls zwei gepufferte Systeme erprobt. Einerseits wurden HN-Puffer-Liposomen mit einem pH von 7,4 sowohl innerhalb als auch außerhalb der Liposomen verwendet, andererseits kamen Citrat-Puffer-Liposomen mit einem pH von 4 innerhalb und außerhalb der Liposomen zum Einsatz. Auf

einen aktiven Einschluss wurde verzichtet, da dieser sowohl im eigenen Vorversuch mit dU nicht Erfolg versprechend erschien, als auch als von der Arbeitsgruppe um U. Massing als nicht gut praktikabel beschrieben wird (persönliche Mitteilung U. Massing an M. Hossann). Wie bei den Glucose-5%-Liposomen wurden die Liposomendispersionen 1:1 (vol/vol) mit 38 mg/ml Gemcitabinlösung verdünnt und bei 40°C beziehungsweise 60°C über Zeiträume von 5 bis 120 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde schon makroskopisch deutlich, dass bis zu einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei beiden Liposomendispersionen nicht die bei den Glucose-5%-Liposomen beobachteten geleeartigen Veränderung auftraten. Lediglich nach 120 Minuten Inkubation ließen sich nur noch die HN-Puffer-Gemcitabin-TSL säulen; die Citrat-Puffer-TSL konnten wie zuvor die Glucose-5%-Gemcitabin-TSL nicht weiter verarbeitet werden. Infolgedessen wurde auch hier von der Bildung nicht-liposomaler Strukturen ausgegangen.

Die Gemcitabin-TSL wurde jeweils gegen HN-Puffer pH 7,4 gesäult, sodass sich die resultierenden Gemcitabin-TSL lediglich durch die Zusammensetzung der wässrigen Phase innerhalb der Liposomen unterschieden.

Bei der Qualitätsüberprüfung zeigten beide Formulierungen einen kleinen PDI um 0,1 und in Hinblick auf die Größe eine zu den nativen Liposomen nur um immer etwa 20 nm betragende Größenverringern. Einzige Ausnahme bildeten die Gemcitabin-TSL nach 120 Minuten Inkubation: hier bestätigt der PDI von  $0,4 \pm 0,1$  eine hohe Inhomogenität der entstandenen Dispersion.

#### 4.5.3 Interaktion von Gemcitabin mit den Phospholipiden

Direkter Einschlussversuch mit dU: die Bildung von Lyso-PC als Abbauprodukt von Phosphatidylcholin bei niedrigem und hohem pH ist bekannt (Moog et al. 2000). Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die Lipidstruktur des Lipidfilms durch das saure dU derart geschädigt wurde, dass sich entweder keine multilamellären Vesikel mehr bilden konnten, oder aber sich große Konglomerate ausgebildet haben, die aufgrund ihrer Komplexität die Säulen nicht passieren konnten. Erst ein Lyso-PC-Gehalt >10% behindert die Bildung liposomaler Strukturen (Grit und Grommlin 1993).

Eine weitere denkbare Ursache sind direkte Wechselwirkungen zwischen den Lipiden und den dU-Molekülen. Bilden sich hier Quervernetzungen, kann dies die Bildung von Lipiddoppelschichten und somit von Liposomen unmöglich werden.

Indirekte Einschlussversuche: die vor allem in Kapitel 3.1.9.2 beschriebenen Erfahrungen mit den verschiedenen nativen Liposomendispersionen können auf diversen Interaktionen zwischen dem Wirkstoff Gemcitabin und den verwendeten Liposomen beruhen. Die



Hydrolyse von Phospholipiden und Bildung von Lyso-PC in Gegenwart von Gemcitabin ist auch hier ein möglicher Erklärungsansatz. Die geringste Entstehung von Lyso-PC wurde bei einem pH von 7,3 beschrieben (Moog et al. 2000), was mit den eigenen Beobachtungen übereinstimmt. Die Glucose-5%-haltigen Liposomen sind als ungepuffertes System zu betrachten, sodass bei Zugabe der sauren Gemcitabinlösung tendenziell eine Abnahme des pH-Wertes angenommen werden muss. Hinzu kommt, dass die Hydrolyse durch Inkubation bei 60°C beschleunigt wird, so genanntes „aging“ (Moog et al. 2000), was die schon makroskopisch sichtbaren Veränderungen im Anschluss an die Inkubation plausibel macht. Im Gegensatz dazu zeigten die Liposomen auf HN-Puffer-Basis nach Zugabe von Gemcitabin stabile Werte hinsichtlich der Lipidzusammensetzung. Hierfür wird die Puffereigenschaft sowie der pH von 7,4 verantwortlich gemacht.

#### 4.5.4 Einschlusseffizienz

Die Einschlusseffizienz unter Anwendung der beschriebenen indirekten Methode beträgt für die HN-Puffer-Gemcitabin-TSL und für die Citrat-Puffer-Gemcitabin-TSL  $6,6\% \pm 0,6$ . Im Vergleich zum passiven Einschluss von CF, bei dem Einschlusseffizienzen zwischen 5% und 8% erreicht werden (Lindner et al. 2004) ist dies ein zufrieden stellendes Ergebnis. Eine höhere Einschlusseffizienz >10% war mit dem verwendeten Verfahren nicht zu erreichen.

Andere publizierten Einschlusseffizienzen von ~90% (Celano et al. 2004; Cosco et al. 2009; Paolino et al. 2010) sind mit dem angewendeten passiven Einschluss nicht vergleichbar, da es sich dabei um aktive Einschlussmethoden handelt oder der Begriff der Einschlusseffizienz anders definiert wurde. Zudem sind diese hohen Einschlusseffizienzen kritisch zu betrachten, da die Einschlusseffizienz in der Publikation von Celano et al. 2004 anders definiert ist. Hier wird nicht nur der im Liposom enthaltene Wirkstoff betrachtet, sondern auch der zwischen den Liposomen befindliche Wirkstoff in die Angabe der Einschlusseffizienz mit einbezogen (Celano et al. 2004).

In einer weiteren Arbeit ist eine Einschlusseffizienz von 47% angegeben (Bornmann et al. 2007). Hier ist der Vergleich der Präparationsmethodik eher möglich, da ebenfalls die Inkubation als Einschlussbeschleunigung verwendet wurde. Hauptunterschied ist die Anwendung der dualen asymmetrischen Zentrifugation (DAC), mit welcher sehr hoch konzentrierte Liposomendispersionen hergestellt werden können. Dies wiederum führt zu der hohen Einschlusseffizienz. Weitere Unterschiede finden sich bei der Liposomenformulierung (nicht-thermosensitive Liposomen mit einer Mannitol 5%-haltigen inneren Phase) sowie bei der weiteren Aufbereitung des liposomalen Gemcitabin nach der Inkubation. Durch die DAC, einem Verfahren zum schnellen Vermischen von viskösen

Komponenten, wird der Wirkstoffeinschluss in die Liposomen erreicht (Massing 2008). Allerdings fallen bei dieser Methode hohe PDI  $>0,2$  auf (Hirsch et al. 2009), was ein Hinweis auf den Schwachpunkt dieser Methode ist. Eine weitere Problematik besteht darin, dass nur geringe Liposomenmengen auf diese Weise hergestellt werden können; für die großtechnische Anwendung bleibt die DAC interessant (persönliche Mitteilung U. Massing an M. Hossann).

#### **4.6 TEMPERATURÖFFNUNGSVERHALTEN VON GEMCITABIN-TSL**

Das Temperaturöffnungsverhalten der HN-Puffer-Gemcitabin-TSL und der Citrat-TSL ist mit dem der in der Arbeitsgruppe bekannten Doxorubicin-TSL vergleichbar (Hossann et al. 2007). Aufbauend auf dem beschriebenen Vorgehen zum Nachweis des ausgetretenen Wirkstoffs wurde inzwischen eine Methode im Labor etabliert, mithilfe der HPLC eine präzisere und effizientere Bestimmung des Freisetzungsverhaltens der Gemcitabin-TSL zu untersuchen (unpublizierte Daten).

Die Wirkstofffreisetzung erfolgt in einem Temperaturbereich ab  $41^{\circ}\text{C}/42^{\circ}\text{C}$ ; bei Temperaturen unter  $41^{\circ}\text{C}$  weisen die Gemcitabin-TSL kaum eine Freisetzung auf. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die klinische Applikation, da im Rahmen der Chemotherapie, der damit einhergehenden Knochenmarksdepression und resultierender Neutropenie, das Auftreten von Fieber oder subfibrielen Temperaturen nicht selten ist. Durch die gezielte Gemcitabinfreisetzung im Tumorgebiet gelangt weniger freier Wirkstoff in das gesunde Gewebe und hat durch die reduzierte systemische Belastung positive Auswirkungen auf das Nebenwirkungsprofil, nicht zuletzt, da die Gesamtdosis des liposomal applizierten Gemcitabins geringer ist, als die des sonst frei injizierten Gemcitabins. Leider war eine Untersuchung der Gemcitabin-TSL in einem physiologischen Medium wie fetalem Kälberserum nicht möglich. Dies lag an den fehlenden Möglichkeiten der Auftrennung und des fehlerfreien Wirkstoffnachweises. Dies konnte mittlerweile behoben werden, ist aber nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Zudem wird die Kombination von Gemcitabin und Hyperthermie weiter erforscht um eine möglichst synergistische, zeitliche Abstimmung dieser beiden Komponenten aufeinander zu erarbeiten.



#### 4.7 TEIL II - ZELLKULTUR

Die Zellkultur stellt die erste Instanz der in vivo Versuche bei Erprobung neuer Zytostatika dar. Allerdings wurde von der Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass Versuchsreihen mit liposomalem Wirkstoff in der Zellkultur fehleranfällig sind und die Aussagekraft der Tierversuche nicht erreichen können (unpublizierte Daten der AG Liposomen). Es wurde gezeigt, dass Liposomen sich nach der Inkubation im Wasserbad nicht von der Zelloberfläche waschen lassen und so theoretisch ein weiterer Wirkstoffaustritt über die durch das Versuchsprotokoll festgelegten Zeiträume hinaus möglich ist. Dies wiederum verfälscht die tatsächliche Wirkung der Zytostatika-haltigen TSL.

Die Zellkultur diente hier der Feststellung der Empfindlichkeit der Zelllinien für Gemcitabin um Anhaltspunkte für spätere Untersuchungen zum Beispiel am Rattenmodell zu schaffen.

FG und L3.6 sind Derivate der COLO 357 Zelllinie (Tzanakakis et al. 2003) wobei die L3.6 Variante im Tierversuch ein erhöhtes Metastasierungspotential aufweist, welches offenbar mit der Aktivität der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B und mit der Expression von des VEGF (vascular endothelial growth factor) einhergeht (Bruns et al. 1999, Tzanakakis et al. 2003). Die Tatsache, dass die beiden Zelllinien Varianten voneinander sind, erklärt die hohe Übereinstimmung der Zellmorphologie und der Gemcitabinempfindlichkeit. Die verwendeten MIA PaCa 2 Zellen wurden in dieser Hinsicht nicht beachtet, da eine Verunreinigung oder gar genetische Veränderung der Kultur nicht ausgeschlossen werden konnte und die erhobenen Ergebnisse somit nicht verwertbar waren. Für diese Annahme sprach die fehlende Gemcitabinempfindlichkeit: eine IC<sub>50</sub> wurde nicht erreicht, selbst bei sicher zytotoxischen Dosen (Anhaltspunkt war eine publizierte IC<sub>50</sub> von 19,4nM von Bornmann et al. 2008). Darüber hinaus fiel der außergewöhnlich hohe Nährstoffverbrauch auf, welcher durch Indikatorumschlag angezeigt wurde und nicht mit einem übermäßigen mikroskopisch beobachtbaren Kulturwachstum vereinbar war.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, das Pyrimidinanalogon Gemcitabin (2'2'-difluorodeoxycytidin) in thermosensitive Liposomen einzuschließen und eine effektive temperaturgetriggerte Freisetzung in einem Bereich der milden Hyperthermie von 41°C bis 42°C nachzuweisen. Dies ist bereits mit anderen Zytostatika gelungen und stellt eine viel versprechende Optimierung der modernen Chemotherapie von soliden Tumoren im Rahmen der zielgerichteten Zytostatikaapplikation dar.

Unter Berücksichtigung publizierter Erkenntnisse über den Einschluss von Gemcitabin in nicht-thermosensitive Liposomen, wurde eine geeignete Methode für die Herstellung von Gemcitabin-TSL entwickelt. Die besten Ergebnisse erzielten dabei Gemcitabin-TSL auf HN-Puffer-Basis, da sie sowohl bei Betrachtung der Qualitätskriterien wie Größe, Polydispersionsindex und in der Dünnschichtchromatographie mit den in der Literatur beschriebenen Formulierungen vergleichbar und diesen sogar überlegen waren.

Das Öffnungsverhalten in wässriger Lösung zeigte nur eine geringe Freisetzung von Gemcitabin im Temperaturbereich  $< 41^{\circ}\text{C}$  und eine rapide Wirkstofffreisetzung bei Inkubation  $> 41^{\circ}\text{C}$ , was den gestellten Anforderungen entspricht.

Weiterhin waren die in dieser Arbeit untersuchten Acetonitril-Extraktionen Grundlage für eine HPLC-Methode, die inzwischen im Liposomenlabor etabliert ist.

Die entwickelte Gemcitabin-TSL-Formulierung befindet sich aktuell bereits in der Erprobung im Tierversuch, in denen bereits viel versprechende neue Ergebnisse gewonnen werden konnten. Die gezeigten Ergebnisse liefern zudem einen Einstieg in weitere Entwicklung von liposomalem Gemcitabin.

Zum Abschluss kann gesagt werden, dass mit dieser Arbeit der Einstieg in den zielgerichteten Gemcitabintransport mittels thermosensitiver Liposomen und Hyperthermie ermöglicht wurde. Weitere Ergebnisse aus Tierversuchen dürfen in Aussicht auf eine etwaige klinische Nutzung mit Spannung erwartet werden.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Adachi S, Kokura S, Okayama T, Ishikawa T, Takagi T, Handa O, Naito Y and Yoshikawa T (2009): Effect of hyperthermia combined with gemcitabine on apoptotic cell death in cultured human pancreatic cancer cell lines. *Int. J. Hyperthermia*; 25(3): 210-219

Baldwin SA, Beal PR, Yao SYM, King AE, Cass CE, Young JD (2004): The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447: 735-743

Benson JR, Hare PE (1975): o-Phthalaldehyde: Fluorogenic Detection of Primary Amines in the Picomole Range. Comparison with Fluorescamine and Ninhydrin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72(2): 619-622

Bree C van, Beumer C, Rodermond HM, Haveman J, Bakker PJM (1999): Effectiveness of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) combined with hyperthermia in rat R-1 rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo. *Int. J Hyperthermia* 15(6): 549-556

Bornmann C, Graeser R, et al (2008): A liposomal formulation of Gemcitabine is active in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer accessible to bioluminescence imaging. *Cancer Chemother Pharmacol.* 61: 395-405

Bruns, CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ (1999): In Vivo Selection and Characterization of Metastatic Variants from Human Pancreatic Adenocarcinoma by Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. *Neoplasia* 1 (1): 50-62.

Bull JCM, Strebel FR, Jenkins GN, Deng W and Rowe RW (2008): The importance of schedule in whole body thermochemotherapy. *Int J Hyperthermia* 24(2): 171-181

Bull JCM, Scott GL, et al. (2008): Fever-range whole-body thermal therapy combined with cisplatin, gemcitabine, and daily interferon- $\alpha$ : A description of a phase I-II protocol. *Int J Hyperthermia* 24(8): 649-662

Celano M, Calvagno MG, Bulotta S, Paolino D, Arturi F, Rotiroti D, Filetti S, Fresta M and Russo D (2004): Cytotoxic effects of Gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *BMC Cancer* 4:63

Chen Q, Krol A, Wright A, Needham D, Dewhirst MW and Yuan F (2008): Tumor microvascular permeability is a key determinant for antivasular effects of doxorubicin encapsulated in a temperature sensitive liposome. *Int J Hyperthermia*, 1-8, iFirst

Cho HW , Choi JY et al. (2011): Pancreatic Tumors: Emphasis on CT Findings and Pathologic Classification. *Korean J Radiol* 12(6):731-739

Cosco D, Bulotta A, Ventura M, et al. (2009): In vivo activity of gemcitabine-loaded PEGylated small unilamellar liposomes against pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* (Springer Verlag) Published online

Drummond DC, Noble CO, Hayes M, et al. (2008): Pharmacokinetics and In Vivo Drug Release Rates in Liposomal Nanocarrier Development. *J Pharm Sci* 97: 4696-4740

Drummond DC; Meyer O; Hong K; Kirpotin DB and Papahadjopoulos D (1999): Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmaceutical Reviews* 51(4): 691-743.

Eibl H, Lands WEM (1969): A New, Sensitive Determination of Phosphate. *Analytical Chemistry* 30: 51-57

Graeser R, Bornmann C, Esser N, et al. (2009): Antimetastatic Effects of Liposomal Gemcitabine and Empty Liposomes in an Orthotopic Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Pancreas* 00: 00-00

Grapin-Button A (2005): Ductal cells of the pancreas. Cells in focus. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 504-510

Gray JH, Owen PR and Giacomini KM (2004): The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447: 728-734

Gregoriadis G (1974): Control of the Rate of Hepatic Uptake and Catabolism of Liposome-Entrapped Proteins Injected into Rats. Possible Therapeutic Applications. *Eur J Biochem.* 47: 179-185

Grenacher L, Klauss M (2009): Computed tomography of pancreatic tumors. *Radiologe* 49(2):107-23

- Grit M and Crommelin DJA (1993): Chemical stability of liposomes" implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64: 3-18
- Hahn SA, Bartsch DK (2004): Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Gastroenterol Clin N Am* 33: 919-934
- Hanczkó R, Jámboer A, Perl A and Molnár-Perl I (2007): Advances in the o-phthalaldehyde derivatizations. Comeback to the o-phthalaldehyde-ethanethiol reagent. *J Chromatogr A* 1163: 25-42
- Herold G und Mitarbeiter (2009): Innere Medizin. *Gerd Herold*, Köln
- Hettinga JV, Konings AW, Kampinga HH: Reduction of cellular cisplatin resistance by hyperthermia – a review (1997): *Int J Hyperthermia* 13: 439-457
- Hilbig A and Oettle H (2008): Gemcitabine in the treatment of metastatic pancreatic cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 8(4): 511-523
- Hildebrandt B, et al. (2002): The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 43: 33-56
- Hirsch M, Ziroli V, Massing U, et al. (2009): Preparation of small amounts of sterile siRNA-liposomes with high entrapping efficiency by dual asymmetric centrifugation (DAC). *Journal of Controlled Release* 135: 80-88
- Hossann M, et al. (2007): In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 2491-2499
- Hossann M, Wang T, Lindner LH et al. (2010): Size of thermosensitive liposomes influences content release. *Journal of Controlled Release* 147: 436–443
- Issels R (2008): Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer* 44: 2546-2554
- Kaufmann-Kolle P (1986): Liposomen aus synthetischen Phospholipiden: Struktur, Stabilität und biologisches Verhalten

- Kelly DM, Benjamin IS (1995): Pancreatic carcinoma. *Annals of Oncology* 6: 19-28
- Koning GA, Eggermont AMM, Lindner LH, ten Hagen TLM (2010): Hyperthermia and Thermosensitive Liposomes for Improved Delivery of Chemotherapeutic Drugs to Solid Tumors. *Pharm Res.* (Springer Verlag) Published online: 28. April 2010
- Kulke MH, Tempero MA et al. (2009): Randomized Phase II Study of Gemcitabine Administered at a Fixed Dose Rate or in Combination With Cisplatin, Docetaxel, or Irinotecan in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer: CALGB 89904. *J Clin Oncol* 27:5506-5512
- Lanz C, Früh M, Thormann W, Cerny T, Lauterburg BH (2007): Rapid determination of gemcitabine in plasma and serum using reversed-phase HPLC. *J Sep Sci* 30: 1811-1820
- Lindl T (2000): Zell- und Gewebekultur. *Spektrum Akademischer Verlag* (Gustav Fischer) 4. Auflage
- Lindner LH (2000): Neuartige kationische Lipide mit freien Hydroxylgruppen zur Oligonukleotid- und Plasmid-DNA-Transfektion in Gegenwart von Serum. *Shaker Verlag*
- Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H et al. (2004): Novel Temperature-Sensitive Liposomes with Prolonged Circulation Time. *Clinical Cancer Research* 10: 2168-2178
- Lindner LH, Hossann M (2010): Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 13(1):111-23.
- Lindner LH, Schlemmer M et al. (2005): Risk assessment of early progression among 213 pts with high-risk soft tissue sarcomas (HR-STS) treated with neoadjuvant chemotherapy  $\pm$  regional hyperthermia: EORTC 62961/ESHO-RHT 95 intergroup phase III study. 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Part I of II *Journal of Clinical Oncolog* 23 (16S), 2005: 9020
- Lindner LH, Hossann M, Vogeser M et al. (2007): Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release. *Journal of Controlled Release* 125: 112-120

- Mabrey S, Sturtevant JM (1976): Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by sensitivity differential scanning calorimetry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 3862-3866.
- Mackey JR, Mani RS, Selner M, et al. (1998): Functional Nucleoside Transporters Are Required for Gemcitabine Influx and Manifestation of Toxicity in Cancer Cell Lines. *Cancer Research* 58: 4349-4357
- Massing U, Cicko S, Ziroli V (2007): Dual asymmetric centrifugation (DAC) – A new technique for liposome preparation. *Journal of Controlled Release* 125: 16-24
- McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J (1984): Cytogenetic effects of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures: a Review. *In Vitro* 20 (1): 1-18
- Milella M, Alain J, Gelibter AJ, Pino MS, Bossone G, Marolla P, Sperduti I, Cognetti F (2010): Fixed-Dose-Rate Gemcitabine: A Viable First-Line Treatment Option for Advanced Pancreatic and Biliary Tract Cancer. *The Oncologist* 15:e1– e4
- Mills JK, Needham D (2005): Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1716: 77 – 96
- Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I and Mazzei T (2006): Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology* 17 (5): 7-12
- Mohr G, Schlokat U, et al. (2000): Permanent Mycoplasma Removal from Tissue Culture Cells: A Genetic Approach. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5: 84-91
- Moog R, Brandl M, Massing U, et al. (2000): Effect of nucleosid analogues and oligonucleotides on hydrolysis of liposomal phospholipids. *International Journal of Pharmaceutics* 206: 43-53
- Moog R, Burger AM, Massing U, et al. (2002): Change in pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior of gemcitabine in human tumor xenografts upon entrapment in vesicular phospholipid gels. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49: 356-366
- Müller M und Mitarbeiter (2007): Chirurgie für Studium und Praxis - 9. Auflage, Jahrgang 2008/2009. *Medizinische Verlags- und Informationsdienste*, Breisach

- New RRC (1997): Liposomes – A practical approach. *Oxford Univ. Press*, Oxford
- Ohguri T, Imada H, Korogi Y, et al. (2008): Concurrent chemoradiotherapy with gemcitabine plus regional hyperthermia for locally advanced pancreatic carcinoma: initial experience. *Radiat Med.* 26: 587-596
- Paolino D, Cosco D, Fresta M, et al. (2010): Gemcitabine-loaded PEGylated unilamellar liposomes vs GEMZAR®: Biodistribution, pharmacokinetic features and in vivo antitumor activity. *J Control Release* doi:10.1016/j.jconrel.2010.02.021
- Pastor-Anglada M et al. (2005): Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Research* 107: 151-164
- Ponce AM, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, et al. (2006): Hyperthermia mediated liposomal drug delivery. *International Journal of Hyperthermia* 22(3): 205-213
- Riede UN, Werner M, Schaefer HE (2004): Allgemeine und spezielle Pathologie – 5. komplett überarbeitete Auflage. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart
- Schagon O (1996): Liposomen als potentielle Arzneistoffträger – Variation der biopharmazeutischen Eigenschaften durch 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-oligo-glycerine. *Shaker Verlag*
- Schmidt R (2011): Neuartige thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren - Charakterisierung in vitro und in vivo. Doktorarbeit
- Schneider G, Schmid RM (2003): Genetic alterations in pancreatic carcinoma. In: *Molecular Cancer* 2:15
- Schneider G, Schmid RM (2005): Pathogenese des Pankreaskarzinoms. Bereits Konsequenzen für künftige therapeutische Ansätze? *Internist* 46: 157-165
- Seynhaeve AL, Hoving S, Ten Hagen et al. TL (2007): Tumor necrosis factor alpha mediates homogeneous distribution of liposomes in murine melanoma that contributes to a better tumor response. *Cancer Res.* Oct 1;67(19):9455-62
- Singer SJ and Nicolson GL (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(23): 720-31



Träuble H, Eibl H (1974): Electrostatic Effects on Lipid Phase Transitions: Membrane Structure and Ionic Environment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71(1): 214-219

Tzanakakis GN, et al. (2003): The Metastatic Potential of Human Pancreatic Cell Lines in the Liver of Nude Mice Correlates Well With Cathepsin B Activity. *International Journal of Gastrointestinal Cancer* 34 (1): 27-38

Udenfriend S, Stein S, Böhlen P, Dairman W, Leimgruber W, Weigle M (1972): Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science* 178 (63): 871-872

Wust P, Hildebrandt B, Schlag PM, et al. (2002): Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol* 3: 487-497

Yatvin MB, et al. (1978): Design of Liposomes for Enhanced Local Release of Drugs by Hyperthermia. *Science* 202: 1290-1292

Ying ER, Zhu LM, Liu BX (2012): Developments in metastatic pancreatic cancer: Is gemcitabine still the standard? *World J Gastroenterol* 18(8): 736-745